



GUILHERME DE MOURA MACIEL

**MICROENCAPSULAÇÃO DE *LACTOBACILLUS*
ACIDOPHILUS POR SPRAY-DRYING UTILIZANDO SORO
DOCE E LEITE DESNATADO**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GUILHERME DE MOURA MACIEL

**“MICROENCAPSULAÇÃO DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*
POR SPRAY-DRYING UTILIZANDO SORO DOCE E LEITE
DESNATADO”**

Orientador (a): Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO GUILHERME DE
MOURA MACIEL E ORIENTADO PELA
PROF^A. DRA. MIRNA LÚCIA GIGANTE

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

M187m Maciel, Guilherme de Moura, 1988-
Microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* por
spray-drying utilizando soro doce e leite desnatado /
Guilherme de Moura Maciel. -- Campinas, SP: [s.n.], 2013.

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

1. *Lactobacillus acidophilus*. 2. Leite desnatado. 3.
Soro. 4. Spray drying. 5. Simulação gastrointestinal.
I. Gigante, Mirna Lúcia. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* by spray-drying using sweet whey and skim milk

Palavras-chave em Inglês:

Lactobacillus acidophilus

Skim milk

Whey

Spray drying

Gastrointestinal simulation

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Mirna Lúcia Gigante [Orientador]

Carlos Raimundo Ferreira Grosso

José Francisco Pereira Martins

Data da defesa: 08-03-2013

Programa de Pós Graduação: Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante
Orientadora

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Membro Titular
DEPAN/FEA/UNICAMP

Prof. Dr. José Francisco Pereira Martins
Membro Titular
DTA/IT/UFRRJ

Dra. Izildinha Moreno
Membro Suplente
ITAL

Dra. Alcina Maria Lissere
Membro Suplente
IAL

*“Alguns homens veem as coisas como são,
e perguntam: Por quê? Eu sonho com as
coisas que nunca existiram e pergunto:
Por que não?”*

George Bernard Shaw

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu amor, fidelidade e incontáveis bênçãos.

Aos meus pais, Meire e Genilson, por serem minha inspiração, apoio e por não medirem esforços para que eu seguisse meus sonhos.

Aos meus irmãos Roberta, Rodrigo, Alexandre e à pequena Sofia, cujo amor e companheirismo foram fundamentais para esta conquista.

Aos meus avós Wilson, Heodenir e Manoel (*in memoriam*) e em especial à vó Didi, por transmitirem os valores mais importantes que carrego comigo.

Aos meus queridos Paulo César e Loiva por todo amor e incentivo.

Aos meus primos Rafael e Fernanda, Tatiana e Alex, Thiago e Lílian, Adriana, Gabriel e Vanessa pela torcida, carinho e compreensão pelas ausências nos últimos anos.

Aos meus tios Denilson e Maria de Fátima e Reinaldo e Marilza, e aos dindos Rafael e Denise pelas conversas e por todo cuidado e alegria que me transmitiram.

À minha orientadora Profa. Mirna Lúcia Gigante pela oportunidade, confiança, pelos muitos ensinamentos e valorosa contribuição à minha formação profissional.

Ao Prof. Carlos Grosso por disponibilizar seus laboratórios, por toda a ajuda na execução dos experimentos e pelos conhecimentos sobre microencapsulação.

Aos Profs. Marcelo Cristianini e Walkíria Viotto pela oportunidade da experiência como estagiário em docência.

Aos companheiros de casa Renata, Alessandro, Carla e Chico, minha família que me deu força e alegria durante essa jornada em Campinas.

Aos primeiros amigos que conquistei em Campinas: Roberto, Bebel, Rodrigo e Mário por toda a ajuda e carinho.

Às amigas-irmãs Karina e Cecília pelo companheirismo e ajuda nesse trabalho, pela paciência, pelo apoio e por todos os momentos felizes que compartilhamos juntos.

Aos amigos que levarei para sempre: Adriana, Aninha, Diogo, Érick, Juliana, Laís, Laura Botti, Laura Matsumura, Letícia, Lígia, Simone e Talita. As muitas risadas que demos juntos com certeza tornaram os meus dias mais alegres!

Aos queridos colegas de Pós-Graduação e estagiárias do DTA, DEPAN e DEA: Grasiela, Bia, Clarice, Gislaine, Carol Merheb, Veri, Mônica, Simone, Miguel, Bruna, Bruno, Tiago, Leandro, Meg, Graciela, Wellington, Marcília, Mária, Bibiana, Alexandre, Adriano, Edilma, Ana Laura, Fabiana, Diana, Cinthia, Ludmila, Márcio, Thaís, Geórgia, Gabriel, Flávia, Joelma, Gislaine, Iza, e Paulinha pela convivência, experiências trocadas e apoio.

Às técnicas de laboratório Bete, Diana e Yara pela paciência e ensinamentos que fizeram deste trabalho possível.

Aos funcionários, técnicos e professores do DTA, em especial à Tânia, Marlene, Léo, Leila, Renata, Fernanda e Profa. Lireny pela convivência e importantes ajudas.

À família “Trankeira”: Fábio, Clóvis, Deivisson, Pedro Alberto e Zé Aldinho por estarem comigo em todos os momentos desde o início dessa jornada acadêmica e serem presentes mesmo com a distância. O amor sinto por vocês é inexplicável!

Aos queridos “amigos-irmãos” Ruralinos, Raquel, Nat, Vic, Carolzinha, Priscilla, Adriana Fortes, Onça e Gislene, e da turma Zootecnia UFRRJ 2006-1, em especial à Alê, Dani, Val, Cat, Dilelis, Túlio, Olavo, Murilo, Magno, Allan e Lívia, aos quais tenho profundo carinho e admiração, por todo o incentivo e afeto que só aumentam com o tempo e a distância!

Ao eterno orientador Prof. José Francisco Pereira Martins pelas muitas horas de ensino e conversas, que despertaram em mim a paixão pela ciência e tecnologia de laticínios.

À Igreja Evangélica Congregacional do Encantado, de onde esse sonho nasceu, em especial ao Rev. Hélio Martins e à Diac. Eliane, e aos amigos Davi, Elaine, Fernandinha, Nathi, Paulo e Karen, Jorge e Day, Jailene e Niel, Fiúza e Mônica, Alessandra, Dona Ivone e a todos os outros pelas orações e suporte espiritual.

Aos amigos Mariana Hallak, Bruno Faria, Gustavo, Douglas, Thayrini, Daniela, Camilly e Victor pelo apoio e compreensão nas muitas ausências.

À CAPES pela bolsa concedida.

Aos Laticínios Porto Alegre Ind. e Com. Ltda. pela doação do soro em pó.

Aqueles que de alguma forma contribuíram com esta jornada, mesmo que da maneira mais singela.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XI
RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Bactérias Probióticas.....	4
3.2. Microencapsulação de micro-organismos probióticos.....	8
3.2.1. <i>Spray-drying</i>	9
3.2.2. Microencapsulação de bactérias lácticas por <i>spray-drying</i>	12
3.3. Resistência às condições gastrointestinais.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1. Material.....	23
4.2. Métodos.....	24
4.2.1. Manutenção e preparo da cultura probiótica para a microencapsulação.....	24
4.2.2. Produção das microcápsulas probióticas.....	25
4.3. Amostragem e análises físico-químicas e morfológicas realizadas.....	27
4.4. Determinações Analíticas.....	28
4.4.1. Análises físico-químicas.....	28
4.4.2. Análises microbiológicas.....	29
4.4.3. Análises métricas e morfológicas.....	30

4.5. Avaliação da viabilidade do <i>Lactobacillus acidophilus</i> microencapsulado durante a simulação das condições gastrointestinais.....	30
4.5.1. Preparo do suco gástrico artificial e suco intestinal artificial	30
4.5.2. Simulação das condições gastrointestinais	31
4.6. Delineamento experimental e análise estatística dos dados.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1. Caracterização físico-química das matérias-primas e soluções encapsulantes	33
5.2. Avaliação das características das microcápsulas de leite desnatado e soro doce e do rendimento de encapsulação	34
5.3 Avaliação da sobrevivência do <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 durante o armazenamento.....	38
5.4 Avaliação da resistência do <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 livre e em micropartículas à simulação das condições gastrintestinais	42
6. CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXO I	47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismos pelos quais os probióticos podem exercer funções benéficas à saúde humana (Adaptado de PRAKASH et al., 2011).....6
- Figura 2.** Desenho esquemático de um *spray-dryer* co-corrente de escala laboratorial. (A): entrada da solução ou suspensão no atomizador; (B): entrada de ar no atomizador; (C): painel de controle; (1): entrada do gás de secagem; (2): aquecimento do gás de secagem; (3): atomização; (4): câmara de secagem; (5): ciclone; (6): coleta do produto seco; (7): saída do gás de secagem.10
- Figura 3.** Especificidade das regiões do trato gastrointestinal humano (Adaptado de Guerra et al., 2012).20
- Figura 4.** Fluxograma geral de produção de micropartículas probióticas de soro e leite desnatado.....26
- Figura 5.** Armazenamento das micropartículas probióticas. A: Estufa; B: Dessecador com sílica gel; C: Embalagem de poliéster metalizado e polietileno selada a vácuo.....27
- Figura 6.** Microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de soro. A: Aumento 500x. Barra = 10 μm ; B: Aumento 2000x, Barra = 10 μm . C: Aumento 5000x, Barra = 1 μm . D: Aumento 3500x. Barra = 10 μm37
- Figura 7.** Microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de leite desnatado. A: Aumento 500x. Barra = 10 μm . B: Aumento 1500x. Barra = 10 μm . C: Aumento 5500x. Barra = 1 μm . D: Aumento 5500x. Barra = 10 μm37
- Figura 8.** Viabilidade (log UFC/g) do *L. acidophilus* La-5 em micropartículas de leite desnatado (MP_{leite}) e soro (MP_{soro}) ao longo do armazenamento a 4°C e 25°C (n=3).38
- Figura 9.** Efeito do tempo de armazenamento na viabilidade (log UFC/g) do *Lactobacillus acidophilus* La-5. ^{a,b,c} Para cada tempo, médias precedidas da mesma letra não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).40
- Figura 10.** Viabilidade (log UFC/mL) do *Lactobacillus acidophilus* La-5 livre, em micropartículas de soro (MP_{soro}) e em micropartículas de leite desnatado (MP_{leite}) submetidas as condições que simulam o trânsito gastrointestinal. ^{a,b} Para cada tratamento, médias precedidas da mesma letra não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$). (n=3).43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Micro-organismos probióticos permitidos pela ANVISA (2008).	7
Tabela 2. Condições de microencapsulação do La-5 no <i>spray-dryer</i> Lab-Plant SD-05 (Lab-Plant, Huddersfield, UK).....	25
Tabela 3. Descrição das análises físico-químicas realizadas segundo a AOAC (1995).	28
Tabela 4. Composição físico-química das soluções de material encapsulante (n=3).	33
Tabela 5. Características físico-químicas e rendimento de encapsulação das microcápsulas de soro e leite desnatado.	34
Tabela 6. Resumo da Análise de Variância (ANOVA). Efeito do tratamento, temperatura e tempo e interação tratamento x temperatura, tratamento x tempo, temperatura x tempo e tratamento x temperatura x tempo sobre a viabilidade do <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 (n=3).	39
Tabela 7. Resumo da Análise de Variância (ANOVA). Efeito do tratamento, tempo e interação tratamento x tempo sobre a sobrevivência do <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 durante a simulação gastrointestinal (n=3).....	42

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da matriz encapsulante no rendimento de encapsulação do *Lactobacillus acidophilus*, na sua viabilidade durante o armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ e $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 90 dias, e na sua resistência à simulação gastrointestinal *in vitro*. As micropartículas foram produzidas a partir de soluções de soro doce e leite desnatado reconstituídos (30% sólidos totais), adicionadas de suspensão de *L. acidophilus* (1% v/v), e submetido a *spray-drying* a temperatura de entrada e saída de 180°C e $85\text{-}95^\circ\text{C}$, respectivamente. Amostras de 5g de micropartículas foram acondicionadas em embalagens de poliéster metalizado e polietileno seladas a vácuo, e armazenadas em dessecadores a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ e $25 \pm 1^\circ\text{C}$. As micropartículas produzidas foram avaliadas quanto às umidade, atividade de água, diâmetro médio e rendimento de encapsulação do *L. acidophilus* no tempo zero, e quanto a viabilidade e atividade de água após 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias de armazenamento. A sobrevivência do probiótico livre e microencapsulado foi avaliada durante a exposição às condições gastrointestinais *in vitro* (pH 2,0 e pH 7,0). Os experimentos foram repetidos 3 vezes e os dados analisados por ANOVA e teste de Tukey para comparação entre as médias ($p < 0,05$). A matriz encapsulante não afetou significativamente o rendimento de encapsulação, o diâmetro médio, a umidade e a atividade de água das partículas, que foi em média de $81,1 \pm 5,0\%$, $12,94 \pm 0,1\mu\text{m}$, $4,53 \pm 0,4\%$ e $0,18 \pm 0,04$, respectivamente. A viabilidade do *L. acidophilus* nas microcápsulas reduziu em média $0,43 \log \text{UFC/g}$ ao final dos 90 dias de armazenamento, e apresentaram contagens superiores a 10^6 UFC/g ao final deste período. Ambas as micropartículas se mostraram eficientes na proteção do probiótico à simulação gastrointestinal, sendo que as micropartículas de leite favoreceram o aumento da viabilidade do *L. acidophilus*.

Palavras-chave: *Lactobacillus acidophilus*, leite desnatado, soro, *spray-drying*, simulação gastrointestinal

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of the encapsulating matrix in the encapsulation yield, resistance to *in vitro* gastrointestinal simulation and viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 during storage at 4 ± 1 °C and 25 ± 1 °C for 90 days. The microparticles were produced from solutions of reconstituted sweet whey and skim milk (30% total solids), inoculated with a suspension of *L. acidophilus* (1% v / v) and subjected to spray-drying at inlet and outlet temperature of 180 °C and 85-95 °C, respectively. Five gram samples of microparticles were packed in metalized polyester and polyethylene packing, vacuum sealed, and stored in desiccators at 4 ± 1 °C and 25 ± 1 °C. The microparticles produced were evaluated for moisture, water activity, average diameter and encapsulation yield of *L. acidophilus* at time zero, and the viability and water activity after 7, 15, 30, 45, 60 and 90 days of storage. The survival of the free and microencapsulated probiotic was evaluated during exposure to *in vitro* gastrointestinal conditions (pH 2.0 and pH 7.0). The experiments were repeated 3 times and the data were analyzed by ANOVA and Tukey's test for the comparison between means ($p < 0.05$). The encapsulating matrix did not significantly affect the encapsulation yield, the average diameter, the moisture and water activity of the particles, which were on average $81.1 \pm 5.0\%$, 12.94 ± 0.1 m, $4.53 \pm 0.4\%$ and 0.18 ± 0.04 , respectively. The viability of the microencapsulated *L. acidophilus* reduced on average 0.43 log CFU/g at the end of 90 days of storage, and remained higher than 10^6 CFU/g at the end of this period. Both microparticles were effective in protecting the probiotic during gastrointestinal simulation, and the skim milk microparticles favored an increasing in the viability of *L. acidophilus*.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus*, skim milk, whey, spray-drying, gastrointestinal simulation.

1. INTRODUÇÃO

O interesse da indústria de alimentos pelo desenvolvimento de novos produtos com apelos funcionais tem aumentado juntamente com o conhecimento e preocupação do consumidor com sua nutrição, culminando na formação de uma tendência na indústria de alimentos para a produção de alimentos saudáveis, que promovam bem-estar (FIESP e ITAL, 2010).

Em relação à saúde gastrointestinal, a percepção quanto aos benefícios proporcionados pelos probióticos tem aumentado desde 2002 e seu consumo no Brasil cresce cerca de 20% ao ano (Knebel, 2011). Os Estados Unidos destacam-se no crescimento desse mercado, com aumento em 2009 de 85,6% da oferta de probióticos nas categorias iogurtes, suplementos alimentares, barras de cereais, queijos e bebidas à base de leite ou soja, em relação a 2008 (FIESP e ITAL, 2010).

Para que os efeitos benéficos relacionados aos probióticos sejam efetivos, uma grande quantidade de micro-organismos deve chegar viável ao intestino após sobreviverem a passagem pelo trato gastrointestinal superior. No Brasil, 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. Porém, quantidades menores podem ser aceitas, desde que a empresa comprove sua eficácia mediante documentação especificada (ANVISA, 2008).

A microencapsulação é apontada como uma tecnologia vantajosa para a veiculação e armazenamento de culturas probióticas. Dentre as técnicas de microencapsulação, a técnica de *spray-drying* possui baixo custo de operação e aparenta ser uma boa alternativa por permitir a produção de culturas em larga escala e pós com características como baixa umidade, maior estabilidade durante

o armazenamento do que culturas frescas ou congeladas, boa viabilidade e funcionalidade após reidratação ou quando submetidos a simulações *in vitro* de passagem pelo trato gastrointestinal, além da possibilidade de seu armazenamento em temperatura ambiente (LIAN et al., 2002; MORTAZAVIAN et al., 2007; PEIGHAMBARDOUST et al., 2011).

Estudos vêm demonstrando a eficiência da microencapsulação de probióticos por *spray-drying* em matrizes de base láctea na manutenção da viabilidade do probiótico durante o armazenamento e na manutenção das propriedades probióticas em relação a outros matérias, tais como amido solúvel, gelatina, goma arábica, inulina e polidextrose (LIAN et al., 2002; CORCORAN et al., 2004; ANANTA et. al, 2005; PAÉZ et al., 2012; DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012).

O aumento da produção e comércio de produtos lácteos em pó, sua versatilidade de utilização como aditivo na manufatura de diferentes tipos de alimentos (ex. iogurte, maionese, barras de cereais), a facilidade de transporte e a possibilidade de armazenamento destes produtos à temperatura ambiente apontam a possibilidade de sua utilização para veiculação de probióticos em alimentos. Diante do exposto, observa-se então uma necessidade de maiores estudos acerca do efeito da microencapsulação em diferentes matrizes lácteas na sobrevivência e manutenção da funcionalidade dos probióticos.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- I. Avaliar a influência da matriz láctea (leite desnatado e soro doce) no rendimento de encapsulação do *Lactobacillus acidophilus* La-5 após sua microencapsulação por *spray-drying*;
- II. Avaliar a influência da matriz láctea (leite desnatado e soro doce) sobre a sobrevivência do *Lactobacillus acidophilus* La-5 microencapsulado durante o seu armazenamento a 4 e 25°C por 90 dias;
- III. Comparar a sobrevivência do *Lactobacillus acidophilus* La-5 livre e microencapsulado em soro doce e leite desnatado durante a simulação *in vitro* da passagem pelo trato gastrointestinal.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Bactérias Probióticas

O trato digestivo é composto de quatro populações principais de micro-organismos, que são definidas como: 1) microbiota autóctone, constituída por populações colonizadoras permanentes em número predominante; 2) microbiota normal, caracterizada por micro-organismos frequentemente presentes que podem variar em número ou apresentar-se esporadicamente ausentes; 3) microbiota patogênica, que são micro-organismos periodicamente adquiridos e, persistindo, causam infecções e doenças; e 4) microbiota alóctone, composta por micro-organismos de outras origens presentes temporariamente no trato gastrointestinal (TGI) (KLAENHAMMER, 2001).

A maioria dos micro-organismos probióticos veiculados em alimentos possuem característica transiente, compondo a população alóctone, e em geral não são capazes de se multiplicar ou de se estabelecer no trato gastrointestinal da maioria dos indivíduos. Por isso a recomendação do consumo contínuo de probióticos (O'TOOLE e COONEY, 2008). Probióticos são então definidos como um suplemento alimentar microbiano vivo, que quando administrado em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro, melhorando as propriedades da microbiota intestinal (FULLER, 1989; FAO/WHO, 2001).

São muitos os benefícios à saúde atribuídos ao consumo de probióticos. Dentre esses se destacam a regulação da mobilidade intestinal, promoção da digestão da lactose em indivíduos lactose-intolerantes, resistência a patógenos entéricos, modulação do sistema imune, tratamento de doenças gastrointestinais, efeito anticarcinogênico, aumento da absorção de minerais, prevenção de doenças coronarianas pela diminuição dos níveis de colesterol e produção de

metabólitos que afetam os níveis sistêmicos de lipídeos sanguíneos (FOOKS et al., 1999; SANDERS et al., 2007; REID, 2008).

Segundo Kopp-Hoolihan (2001), os mecanismos pelos quais os probióticos exercem sua função ainda são especulativos. Dentre as hipóteses levantadas encontram-se a redução do pH intestinal pela produção de ácidos orgânicos, o efeito antagonista a patógenos pela produção de compostos antimicrobianos e antibacterianos, a competição com patógenos por nutrientes e fatores de crescimento, assim como pelos sítios de ligação e recepção, a maior digestão da lactose, a degradação de toxinas e o estímulo a células imunomodulatórias. Os principais mecanismos estão ilustrados na Figura 1 (KOPP-HOOLIHAN, 2011; PRAKASH et al., 2011).

Dentre os micro-organismos colonizadores predominantes no TGI, os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, são considerados exclusivamente benéficos e não provocam nenhuma resposta nociva ou patogênica dentro de seus nichos ecológicos normais (KLAENHAMMER, 2001).

O gênero *Bifidobacterium* é formado por pelo menos 25 espécies de bastonetes caracterizadas como gram-positivos, catalase-negativos anaeróbias, não formadoras de esporos e não móveis. São heterofermentadores produzindo ácido lático e acético como os principais produtos finais do metabolismo de carboidratos. Crescem bem a pH entre 5 e 8 e nas temperaturas mínimas e máximas variando entre 25°C a 28°C e 43°C e 45°C, respectivamente (GOMES e MALCATA, 1999; JAY, 2005).

O gênero *Lactobacillus* caracteriza-se por bactérias gram-positivas, anaeróbias facultativas, não móveis, podendo ser cocos ou bacilos não formadores de esporos e produtoras de ácido lático como principal produto da fermentação de carboidratos, de onde obtém energia. Atualmente é organizado

em três grupos que englobam diferentes espécies, considerando-se basicamente suas características fermentativas (JAY, 2005):

- Homofermentativas obrigatórias: Termobactérias não fermentadoras de pentoses (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. delbrueckii*, etc.);
- Heterofermentativas facultativas: Fermentadoras de pentoses (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. sake*, etc.);
- Heterofermentativas obrigatórias: Produtoras de CO₂ a partir de glicose (*L. fermentum*, *L. brevis*, *L. reuteri*, etc.).

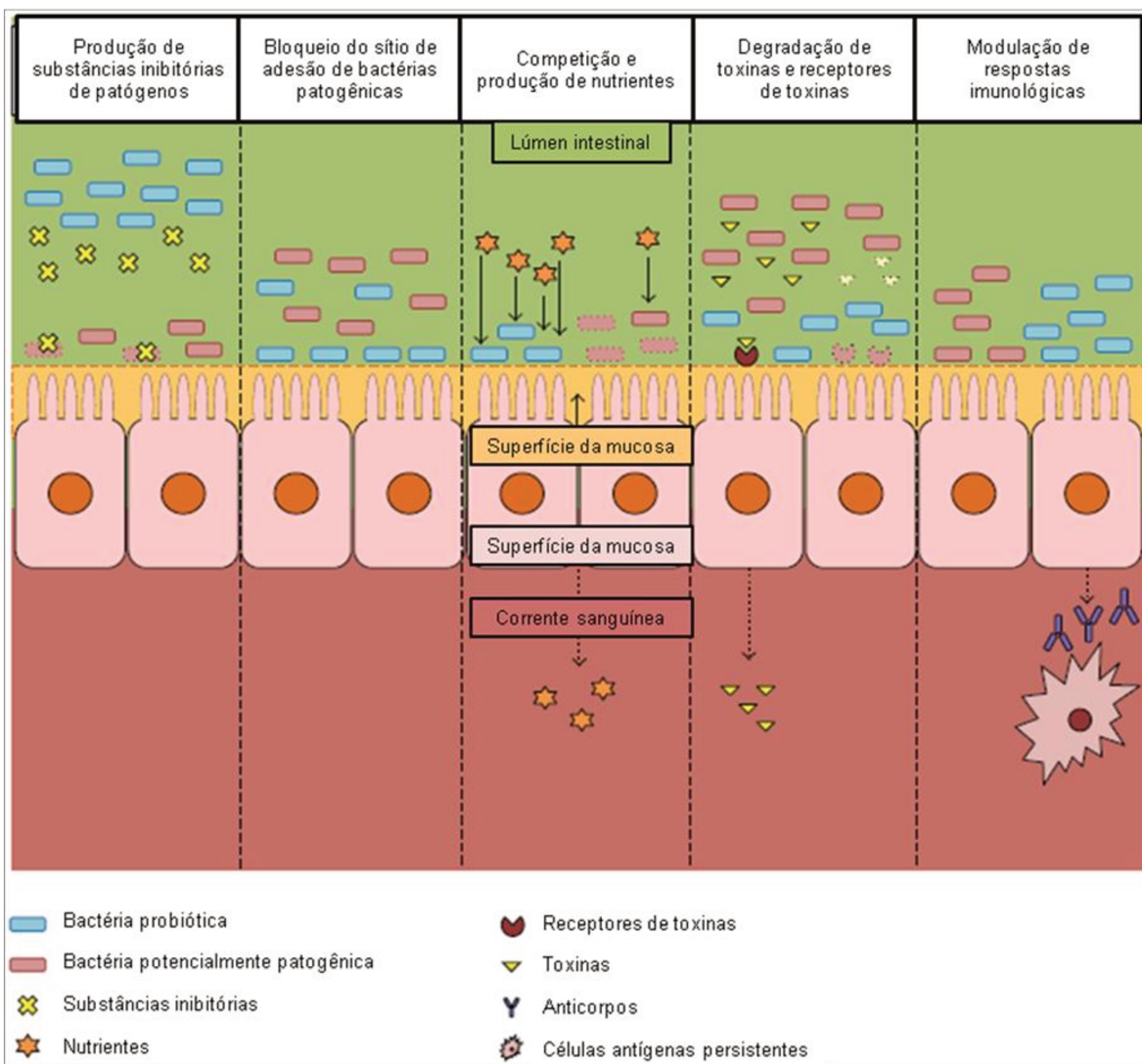


Figura 1. Mecanismos pelos quais os probióticos podem exercer funções benéficas à saúde humana (Adaptado de PRAKASH et al., 2011).

O gênero é ainda subdividido em *Betabacterium*, *Streptobacterium* e *Thermobacterium*. O subgênero *Betabacterium* engloba todos os *Lactobacillus* heteroláticos e, os subgêneros *Streptobacterium* e *Thermobacterium* são diferenciados pela habilidade de crescimento a 15°C, onde não se observa crescimento das bactérias pertencentes ao último subgênero, por exemplo os *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (MASSAGUER, 2006).

Apesar de existirem diferentes micro-organismos probióticos, atualmente os que são aprovados ANVISA (2008) estão apresentados na Tabela 1, e sua alegação funcional deve ser a seguinte: “O (*indicar a espécie do microrganismo*) (*probiótico*) *contribui para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis.*”

Tabela 1. Micro-organismos probióticos permitidos pela ANVISA (2008).

Gênero	Espécies
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>
	<i>casei shirota</i>
	<i>casei</i> variedade <i>ramnosus</i>
	<i>casei</i> variedade <i>defensis</i>
	<i>paracasei</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i>
	<i>animalis</i> subespécie <i>lactis</i>
	<i>longum</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>

3.2. Microencapsulação de micro-organismos probióticos

Do ponto de vista microbiológico, microencapsulação de probióticos pode ser definida como o processo de aprisionamento ou empacotamento dos micro-organismos através de seu revestimento por hidrocolóides convenientes, com a finalidade de separá-los e protegê-los de condições adversas do meio, promovendo sua liberação no meio intestinal (MORTAZAVIAN, 2007). Para a aplicação em alimentos, condições adversas podem estar relacionadas a características intrínsecas de alguns alimentos e seu processamento, como: mudanças no pH, tensões mecânicas, calor, atividade enzimática, pressão osmótica, presença de certos compostos químicos, teor de oxigênio, condição e tempo de estocagem (MANOJLOVIĆ et al., 2010). Outras condições adversas são encontradas durante a passagem pelo TGI relacionadas basicamente a mudanças drásticas no pH e no perfil enzimático de suas diferentes regiões, sendo necessária a proteção aos probióticos pela cápsula também após sua ingestão (GUERRA et al., 2012).

As tecnologias de microencapsulação aplicadas a probióticos são limitadas geralmente a partículas obtidas por gelificação iônica, emulsão, *freeze-drying* ou liofilização e *spray-drying*. A técnica de gelificação iônica ou extrusão é considerada simples e consiste na utilização de polímeros como alginato, ágar, carragena, amido, pectina e gelatina. Estes polímeros gelificam na presença de minerais, principalmente cálcio e potássio, gerando cápsulas pouco uniformes (CHAMPAGNE e KAILASAPATHY, 2008).

Na emulsão, a mistura formada pela suspensão de células e polímero que constituirá o material de parede é introduzida a um óleo vegetal em constante agitação, formando uma emulsão água-em-óleo uniforme. Durante esse processo, a mistura células-polímeros deve se reticular na fase óleo, geralmente, via adição de solução de CaCl_2 . Subsequentemente, procede-se a centrifugação e lavagem

das cápsulas formadas para remoção de resíduos do óleo. As cápsulas formadas são mais uniformes que as de gelificação iônica (ROKKA e RANTAMÄKI, 2010).

Freeze-drying ou liofilização é um método apontado como um dos menos nocivos às células probióticas. Consiste no congelamento de células probióticas na presença de um material carreador a baixas temperaturas, geralmente adicionado de um crioprotetor, seguido por sublimação da água sob vácuo. (MANOJLOVIĆ et al., 2010).

A técnica de *spray-drying* envolve a atomização de uma suspensão ou emulsão de probiótico e material carreador dentro de uma câmara com uma corrente de gás seco e quente, resultando numa rápida evaporação da água, onde as cápsulas obtidas são um pó. Estudos tem revelado que além de polissacarídeos, proteínas podem ser utilizadas como carreadores, resultando num melhor material de parede que a gelatina, o amido solúvel e a goma arábica (GHARSALLAOUI et al., 2007)

3.2.1. *Spray-drying*

Spray-drying é um processo fácil e de operação comum na indústria de laticínios, utilizado na produção em larga escala de ingredientes e produtos lácteos. Por possuir maior eficiência energética, alguns autores sugerem custos 4 a 7 vezes mais baixos do que o processo de liofilização, oferecendo uma alternativa de baixo custo e maior rendimento que a produção em escala comercial de culturas pela liofilização (MORGAN et al., 2006; CHÁVEZ e LEDEBOER, 2007; MENG et al., 2008).

A secagem por *spray-drying* pode ser resumida em 3 etapas: atomização, secagem e recuperação (Figura 2). O desenho e os parâmetros de operação dos

secadores (taxa de alimentação, fluxo do gás e temperatura) juntamente com as propriedades físico-químicas do líquido determinam as características do produto seco (ROKKA E RANTAMÄKI, 2010; SILVA et al., 2011).

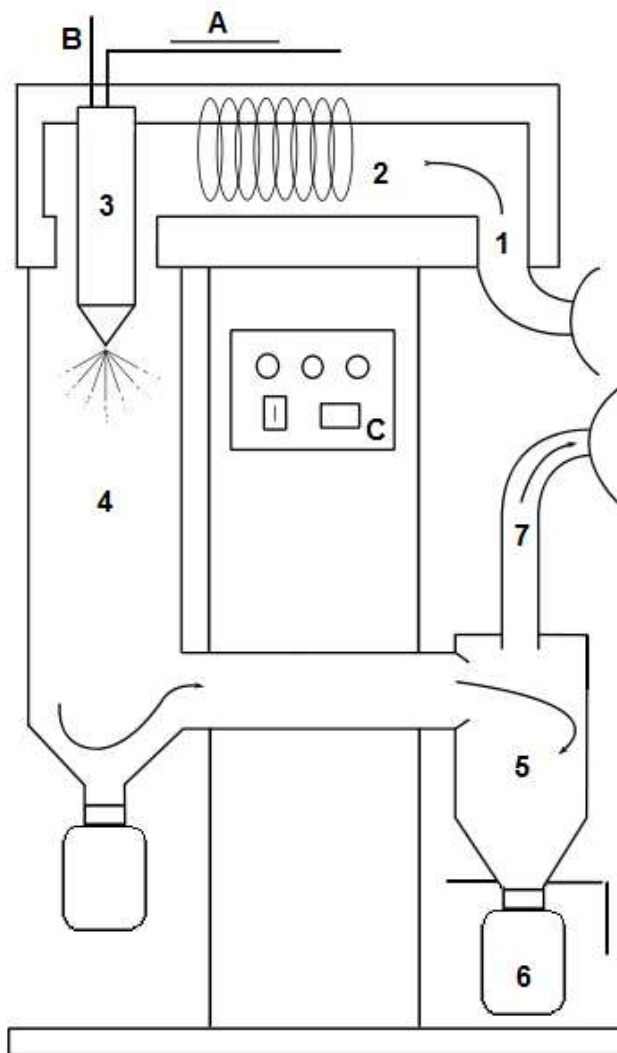


Figura 2. Desenho esquemático de um *spray-dryer* co-corrente de escala laboratorial. (A): entrada da solução ou suspensão no atomizador; (B): entrada de ar no atomizador; (C): painel de controle; (1): entrada do gás de secagem; (2): aquecimento do gás de secagem; (3): atomização; (4): câmara de secagem; (5): ciclone; (6): coleta do produto seco; (7): saída do gás de secagem.

A atomização consiste na formação de um aerossol ou *spray* pela dispersão do líquido em milhares de gotículas individuais. Os aerossóis são geralmente formados por bicos atomizadores pressurizados, rotatórios ou pneumáticos, e sua escolha é baseada na natureza do líquido de alimentação e na característica desejada para o produto seco (PEIGHAMBARDUST et al., 2011).

A etapa de evaporação da água contida nas gotículas do aerossol formado envolve um processo simultâneo de transferência de calor e massa. O contato do ar com as gotículas permite a transferência de calor por convecção do ar aquecido para as gotículas, e é convertido a calor latente durante a evaporação da umidade. A umidade vaporizada é transportada para o ar por convecção através da camada externa de cada gotícula (MASTERS, 2002). Segundo esses autores, a etapa de evaporação pode ser dividida em duas fases:

1. Período de taxa de secagem constante: a migração da umidade do interior para a superfície da gotícula a uma taxa quase constante, suficiente para manter a saturação da superfície da gotícula, promove a perda dessa umidade para o ar a uma taxa constante, mantendo a pressão de vapor parcial e a temperatura superficiais também constantes. Nessa fase, a temperatura da superfície da gotícula é a temperatura de bulbo úmido do ar que entra na câmara de secagem;
2. Período de queda na taxa de secagem: a migração da umidade diminui o teor desta na gotícula e, quando o conteúdo de umidade diminui a ponto de não manter as condições saturadas da superfície, uma camada seca é formada na superfície da gotícula. À partir desse ponto a taxa de evaporação dependerá da taxa de difusão da umidade através da camada seca, que aumenta em espessura com o tempo, promovendo um decréscimo na taxa de evaporação. A temperatura da

superfície da partícula formada passa então a exceder a temperatura do bulbo seco.

Apesar do aumento da temperatura superficial da partícula formada, a atomização promovida pelo spray cria gotículas homogêneas com grande superfície de secagem e tamanho reduzido, que permitem um curto período de residência total no sistema – não mais que 30 segundos em média – e que juntamente com a alta taxa de evaporação da umidade (resfriamento evaporativo) permitem que a temperatura da partícula seca seja consideravelmente menor que a do ar quente que deixa a câmara de secagem (SANTIVARANGKNA et al., 2007).

O processo de secagem é finalizado com a separação das partículas secas formadas do ar aquecido, e seu descarregamento em um coletor diretamente após a passagem pela câmara de secagem ou essas partículas podem ser mais eficientemente separadas, pela utilização de ciclones, *bag fillers*, lavadores a seco e precipitadores eletrostáticos, permitindo maior eficiência na remoção e conseqüentemente menor emissão de partículas finas para a atmosfera com a exaustão do ar (SILVA et. al, 2011).

3.2.2. Microencapsulação de bactérias lácticas por *spray-drying*

A desidratação tem sido o método preferido da indústria para a conservação de micro-organismos ao longo das últimas décadas. Isto se deve principalmente a capacidade destes micro-organismos manter atividade biológica e estabilidade genética por longos períodos de armazenamento e, após reidratação, recuperarem sua atividade metabólica.

Os principais fatores relacionados a injúrias à célula microbiana durante a secagem por *spray-drying* são: i) estresse térmico, relacionado à elevada

temperatura de secagem; ii) estresse osmótico e forças capilares, devido a remoção da água das partículas; iii) estresse oxidativo, pelo contato com o oxigênio presente no ar; iv) aumento da concentração de sal e pH intracelular. Estes fatores sucedem sinergicamente e, caso as injúrias por eles provocadas ao micro-organismo ocorram a níveis letais, causam a perda permanente da viabilidade da célula microbiana (JOHNSON e ETZEL, 1995; TO e ETZEL, 1997; PEIGHAMBARDOUST et al., 2011).

Para que a viabilidade microbiana e a atividade metabólica sejam mantidas após a secagem, algumas estruturas celulares precisam ser mantidas intactas e totalmente funcionais ao serem reidratadas. Segundo a teoria do componente crítico, o calor pode inativar um componente celular crítico, que pode ser único ou que exista em pouquíssimo número na célula (ex. DNA). Sua perda causa a morte celular. Entretanto morte celular pode também ser causada quando existe a inativação de componentes não críticos. A inativação de um grande número destes componentes, que estão presentes em grande número de cópias na célula (ex. ribossomos), causaria a morte celular (SANTIVARANGKNA et al., 2007). Miles (2006) sugeriu que o componente crítico não seria único, mas sim um conjunto de componentes críticos essenciais à manutenção de funções vitais na célula, provendo códigos genéticos necessários à síntese proteica ou ácidos nucleicos. O componente crítico foi redefinido então como um componente cujo número de estruturas em funcionamento deve permanecer acima de um nível crítico para que a célula sobreviva ou reproduza que pode ser, por exemplo, os ribossomos, a parede celular, o DNA e a RNA polimerase.

O calor excessivo pode causar o desdobramento estrutural de macromoléculas como os ácidos nucleicos e proteínas, e quebrar ligações entre monômeros. A desidratação está principalmente relacionada com a alteração da fluidez ou estado físico da membrana citoplasmática, à oxidação e o decréscimo da taxa de ácidos graxos insaturados/saturados que fazem parte de sua

composição. Embora bem conhecidos individualmente, o efeito sinérgico desses dois fatores sobre as estruturas microbianas não foi ainda elucidado (MENG et al., 2008; FU e CHEN, 2011).

Nesse sentido, micro-organismos submetidos à secagem por *spray-drying* precisam superar fatores intrínsecos e extrínsecos que podem ocasionar tais danos celulares. Os fatores intrínsecos estão relacionados a características de tolerância implícitas a um micro-organismo. Essas características podem ser aprimoradas a certo nível por pré-tratamentos (ex. térmicos, pH ácido, NaCl) que favorecem a adaptação das células ao estresse da secagem. Os extrínsecos são fatores relacionados ao material carreador e às condições de secagem – que podem ser otimizados para se conseguir altas taxas de sobrevivência após secagem (FU e CHEN, 2011).

O grau de inativação bacteriana está diretamente relacionado ao binômio tempo-temperatura durante o processo de secagem por *spray-drying* sobre a linhagem selecionada. A sobrevivência microbiana está indiretamente relacionada à temperatura de entrada, porém decresce linearmente com o aumento da temperatura de saída do *spray-dryer*, como resultado do efeito do resfriamento evaporativo durante esta etapa (TO e ETZEL, 1997). Diversos estudos têm sugerido que temperaturas de saída menores que 80°C favorecem maiores taxas de sobrevivência. Porém, partículas obtidas após secagem em temperaturas abaixo desta podem apresentar maior teor de umidade, desfavorecendo a manutenção da viabilidade dos probióticos ao longo do armazenamento (JOHNSON e ETZEL, 1995; GARDINER ET AL., 2000; FÁVARO-TRINDADE e GROSSO, 2002; LIAN et al. 2002; ANANTA et al, 2005).

Como relatado por diversos autores, tanto o meio de crescimento bacteriano quanto o material encapsulante podem exercer efeito protetor sobre as células microbianas durante o processo de secagem, armazenamento, reidratação

e digestão do alimento. Segundo Morgan et al. (2006), aditivos protetores são substâncias como carboidratos, proteínas e polímeros, capazes de formar cristais amorfos, que são um líquido supersaturado termodinamicamente instável e de alta viscosidade. A formação do estado cristalino dentro e fora da célula aumenta a viscosidade a ponto de reduzir a mobilidade de moléculas a um nível mínimo (MORGAN et al., 2006).

Diferentes matrizes já foram utilizadas na encapsulação de probióticos por *spray-drying*, como amidos (O'RIORDAN ET AL., 2001; GODERSKA e CZARNECKI et al., 2008; YING et al., 2010), maltodextrina (LIAN et al., 2002; REDDY et al., 2009), gomas (CHAVÉZ e LEDEBOER, 2007; RODRÍGUEZ-HUERZO, 2007; ZHAO et al., 2008), gelatina (LIAN et al. 2002), proteínas do soro (PICOT e LACROIX, 2004; YING et al., 2010), e leite desnatado reconstituído (SIMPSON et al., 2005; GOLOWCZYC et al., 2010; PAÉZ et al., 2012). Até o momento, o soro doce foi utilizado como matriz encapsulante apenas por De Castro-Cislaghi et al. (2012), porém, estes autores não discutiram o efeito protetor dessa matriz na viabilidade do probiótico durante a microencapsulação por *spray-drying*.

Dentre estas matrizes, o leite desnatado tem se mostrado um poderoso protetor da viabilidade celular durante a secagem por *spray-drying* e tem sido empregado em estudos relevantes (FU e CHEN, 2011; GARCÍA, 2011; SILVA et al., 2011; PAÉZ et al., 2012). Os componentes do leite parecem interagir diretamente com o grupamento polar da membrana fosfolipídica, minimizando os danos a esta durante a secagem e durante o armazenamento prolongado. Principalmente os dissacarídeos, como por exemplo a lactose, são considerados protetores efetivos, pois sugere-se que interajam tanto com as membranas bacterianas quanto com proteínas no processo de remoção da água que ocorre durante a secagem (ANANTA et al., 2005). A proteção fornecida por dissacarídeos pode ser explicada por duas hipóteses:

- 1) Hipótese da substituição da água: Durante a secagem ocorre a remoção da água ligada aos fosfolípidos que compõe a membrana celular e mantém seu estado líquido e bioatividade. A remoção da água, que mantém os grupamentos polares dos fosfolípidos espacialmente separados, aumenta a coesão e compressão da membrana celular, aumentando as possibilidades de interações de van der Waals entre as cadeias de hidrocarboneto. Os fosfolípidos se tornam então susceptíveis a um rearranjo estrutural e a transição de fase de um líquido cristalino para um gel. Esses eventos estariam relacionados ao rompimento da membrana. Como consequência da mudança do estado fisiológico dos lipídeos, a temperatura de fusão ou de transição de fase da membrana (T_m) passa a ser maior. Esta hipótese postula que interações específicas e entre os açúcares do meio e os fosfolípidos garantiriam a estabilização da membrana (estado fluido) durante e após a secagem. Os grupos hidroxila dos açúcares se ligariam por pontes de hidrogênio aos grupos fosfato dos fosfolipídios substituindo espaços antes ocupados pela água. A interação dos açúcares com a membrana diminui a T_m e mantém a membrana celular em estado líquido à temperatura ambiente (CROWE et al., 2002; SANTIVARANGKNA e FOERST, 2008; SANTIVARANGKNA et al., 2008).

- 2) Hipótese da força de hidratação: Também se baseia na capacidade de açúcares em limitar a compressão da membrana celular ou transição líquido-gel através de suas propriedades osmóticas e volumétricas e a vitrificação. A presença de açúcares na solução encapsulante promoveria (sem interação açúcar-lipídeo específica) um aumento de sua pressão osmótica, limitando a remoção de água da interface da membrana celular. Além disso, o volume molecular de açúcares de tamanho moderado manteriam os fosfolipídios separados. Uma posterior redução no estresse ocorreria com a vitrificação do açúcar nos espaços entre os fosfolipídios

durante a secagem. Para proteger as células durante a secagem, Koester et al. () sugerem que a temperatura de transição vítrea (T_g) do açúcar deva ser maior que a T_m da membrana hidratada. Supõe-se que tal proteção ocorra quando a lactose está presente no meio de secagem de bactérias lácticas, visto que sua T_g é de 101°C, e a T_m de células de *L. plantarum* e *L. bulgaricus* quando desidratadas é de 20°C e 40°C, respectivamente (SANTIVARANGKNA e FOERST, 2008; SHUCK, 2011).

A transição de fase gel-líquido também ocorre quando a célula é reidratada, o que aumenta transitoriamente a permeabilidade da membrana em função de descontinuidades entre as fases líquida e gel, podendo causar seu rompimento e vazamento do conteúdo celular (CROWE et al., 2002; SANTIVARANGKNA et al., 2008). O aumento da T_g e manutenção da membrana celular no estado líquido devido a utilização de açúcares no meio de secagem poderia evitar a permeabilidade transitória da membrana, aumentando a recuperação das bactérias após reidratadas.

Além da composição, o teor de sólidos totais (ST) das soluções contendo o material encapsulante parece afetar a sobrevivência do micro-organismo ao processo de microencapsulação por *spray-drying* (ZHAO et al., 2007). Este teor é escolhido pelos autores principalmente mediante a capacidade de operação do equipamento de secagem utilizado, e varia entre 11 e 30% (FU e ETZEL, 1995; LIAN et al., 2002; CORCORAN et al., 2004; ANANTA et al., 2005; RIVEROS et al., 2009). Em condições laboratoriais, a utilização de soluções com teores de sólidos totais maiores que 30% favorece o entupimento do bico atomizador e para soluções com teores menores que 12%, o tempo de secagem não é suficiente para evaporar o conteúdo de água da solução atomizada, mesmo quando o secador é operado à máxima taxa de fluxo de ar, resultando em pós com elevada umidade (RIVEROS et al., 2009).

Outro fator que afeta diretamente a viabilidade de bactérias probióticas é a temperatura de armazenamento das microcápsulas após sua produção. A sobrevivência de micro-organismos microencapsulados por *spray-drying* em função da temperatura de armazenamento já foi relatada por diversos autores (SIMPSON et al., 2005; ABE et al., 2009; REDDY et al., 2009). Maiores taxas de sobrevivência são favorecidas por menores temperaturas de armazenamento (4–6°C) (GOLOWCZYC, 2010; PAÉZ et al., 2012; DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012). Porém, temperaturas entre 15 e 30°C já foram relatadas como eficientes na manutenção da viabilidade de bactérias probióticas (CORCORAN et al., 2004; ANANTA et al., 2005; CHÁVEZ e LEDEBOER, 2007; OLIVEIRA et al., 2007). Estes mesmos autores relataram reduções mais drásticas para pós armazenados a 37°C. O mecanismo de perda de viabilidade em elevadas temperaturas se deve provavelmente a degradação natural de macromoléculas essenciais à vida, considerando-se que proteínas e lipídeos *in vitro* sofrem oxidação e desnaturação, respectivamente, durante prolongados períodos de estocagem (FU e CHEN, 2011).

Diversos estudos sugerem que o principal fator responsável pelo sucesso da microencapsulação por *spray-drying* e da manutenção de microcápsulas com elevadas contagens de probióticos durante o armazenamento parece estar relacionado às características de resistência da bactéria a secagem, que são intrínsecas a cada linhagem. Lian et al. (2002) evidenciaram maior sobrevivência para o *B. longum* B6 em relação a outras linhagens de *B. longum* e *B. infantis* quando encapsulados em diferentes matrizes utilizando $T_{\text{entrada}} = 100^{\circ}\text{C}$ e $T_{\text{saída}} = 50\text{-}60^{\circ}\text{C}$. Após microencapsulação à T_{entrada} de 70°C e $T_{\text{saída}}$ de 46°C , Oliveira et al. (2007) relataram a redução de 0,4 ciclos log na viabilidade do *L. acidophilus* (LAC 4), contra 0,6 ciclos log de redução para o *B. lactis* (BI 01). No entanto, ao trabalharem com temperaturas de secagem mais altas ($T_{\text{entrada}} = 160^{\circ}\text{C}/T_{\text{saída}} = 100^{\circ}\text{C}$), Fávoro-Trindade e Grosso (2002) relataram maior sensibilidade do *L. acidophilus* La-5, que reduziu 2 ciclos log a mais que *B. lactis* Bb-12 após a

microencapsulação. Ao estudarem a sobrevivência de lactobacilos a microencapsulação por *spray-drying* utilizando $T_{\text{entrada}}= 170^{\circ}\text{C}$ / $T_{\text{saída}}= 80-85^{\circ}\text{C}$, Gardiner et al. (2000) evidenciaram uma redução em ciclos log 10 vezes maior para o *L. salivarius* UCC 118 (0,18 ciclos log) em comparação ao *L. paracasei* NFBC 338 (2,0 ciclos log). A escolha da linhagem bacteriana é um gargalo na produção de microcápsulas com elevadas contagens microbianas. Apesar do aumento do número de publicações de estudos com microencapsulação, a maioria utiliza linhagens bacterianas patenteadas, o que limita o uso por indústrias em escala industrial. Assim, ainda é escasso o número de estudos que apresentem a resistência de linhagens comerciais a microencapsulação por *spray-drying*.

3.3. Resistência às condições gastrointestinais

Assim como a resistência a secagem por *spray-drying*, a resistência à passagem pelo trato gastrointestinal superior depende principalmente da espécie e linhagem bacterianas. Muitos estudos têm demonstrado que diferentes linhagens de lactobacilos não possuem a capacidade de sobreviver às drásticas condições do trato gastrointestinal superior. Dessa forma, diferentes tecnologias e estratégias, como a microencapsulação, têm sido propostas para o aprimoramento da sobrevivência bacteriana (PRAKASH et al., 2011).

As drásticas condições encontradas no ambiente gastrointestinal no que diz respeito a variações de pH, mudanças enzimáticas e secreções biliares (Figura 5), são necessárias não só para a completa digestão do alimento, mas também atuam como barreiras naturais contra micro-organismos ingeridos (PRAKASH, et al., 2011; GBASSI et al., 2011).

Apesar de não predizerem respostas quanto a funcionalidade desses micro-organismos no corpo humano, testes de resistência ao ácido gástrico e a

concentrações fisiológicas de bile são frequentemente utilizados para avaliar o potencial probiótico de linhagens bacterianas e parecem contribuir com a avaliação da sobrevivência de probióticos em diferentes matrizes alimentares ao longo da passagem pelo trato gastrointestinal (BURITI, CASTRO e SAAD, 2010; PAÉZ et al., 2012).

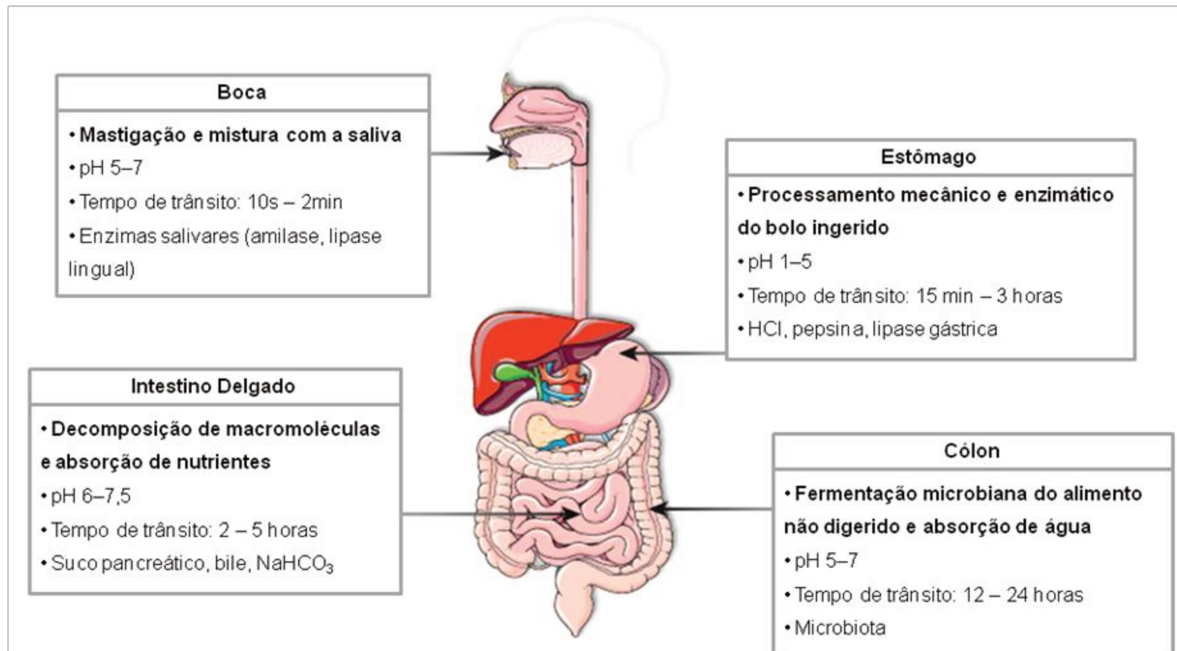


Figura 3. Especificidade das regiões do trato gastrointestinal humano (Adaptado de Guerra et al., 2012).

A sobrevivência do probiótico à simulação gastrointestinal varia de acordo com a linhagem bacteriana, com o material encapsulante ou matriz veiculadora do probiótico e com as características do teste (ex. enzimas, pH, tempo de cada fase, condições de incubação). Diferenças de sobrevivência entre linhagens de uma mesma espécie à simulação gastrointestinal foram estudadas por Paéz et al., 2012. A resistência à simulação gastrintestinal foi comparada entre *L. casei* Nad, *L. acidophilus* A9 e *L. acidophilus* A13 adicionados a diferentes matrizes alimentícias – leite desnatado, leite desnatado e amido ou leite desnatado e

concentrado proteico de soro – antes (cultura fresca + matriz) ou após sua microencapsulação por *spray-drying*. Ao final da simulação (150 min), o *L. acidophilus* A13 microencapsulado em leite desnatado teve sua resistência aumentada em 1,5 ciclos log em relação à cultura fresca adicionada à mesma matriz. Para o *L. casei* Nad e o *L. acidophilus* A9 microencapsulados, independentemente da matriz utilizada, a sobrevivência foi 0,8 a 2 ciclos logarítmicos maior quando comparada às culturas livres.

A fim de estudar o efeito do material encapsulante na sobrevivência do probiótico, Reddy et al. (2009) submeteram o *L. plantarum* CFR 2191 microencapsulado por *spray-drying* em leite desnatado e maltodextrina (10% p/v) aos pH 2,0 e 2,5. Os autores relataram sobrevivências maiores que 95% em ambos os pH após incubação a 37°C por 4 horas. Microcápsulas de diferentes materiais (leite desnatado, goma arábica, gelatina e amido solúvel) produzidas por *spray-drying*, contendo *B. longum* B6, não apresentaram diferença na proteção em relação à bactéria em sua forma livre após 4 horas de exposição ao suco gástrico artificial com pH 3,0, apresentando todos os tratamentos taxas de sobrevivência superiores a 81% (LIAN et al., 2002). A microencapsulação por *spray-drying* de *Bifidobacterium* Bb-12 em soro doce também se mostrou eficaz quanto a proteção do micro-organismo quando exposto as condições gastrointestinais. Após serem incubadas por 3 horas em pH 2,0 à 37°C, as células microencapsuladas de *Bifidobacterium* Bb-12 apresentaram uma redução de 0,73 contra 1,51 ciclos logarítmicos das células na forma livre (DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012).

Devido à complexidade de estudos *in vivo* para sua utilização em testes iniciais de avaliação do potencial probiótico de bactérias e seu comportamento, a necessidade de protocolos eficientes para a realização de testes *in vitro* iniciais é de grande importância antes da realização de posteriores experimentos *in vivo* (GBASSI et al., 2011). Diversos autores vêm demonstrando que a utilização de soluções artificiais de suco gástrico, bile e suco pancreático (de origem suína ou

bovina) em simulações *in vitro* apresentam resultados semelhantes, e às vezes mais drásticos, que ensaios utilizando secreções de origem humana (DEL PIANO et al., 2006a; 2006b e 2008). Dessa forma, estudos de simulação gastrointestinal são uma forma de se avaliar tanto o efeito da secagem sobre a capacidade de bactérias probióticas em resistir a passagem pelo trato gastrointestinal superior, quanto o efeito de diferentes matrizes encapsulantes ou veiculadoras na sobrevivência do probiótico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

Os produtos adquiridos foram procedentes de um mesmo lote de produção em quantidade suficiente para realização de todos os experimentos, a fim de que não houvesse variações em suas composições.

- Produção e embalagem das micropartículas:
 - Cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus* La-5 (Chr. Hansen, Valinhos, Brasil).
 - Leite em pó desnatado instantâneo MOLICO (Nestlé)
 - Soro doce em pó (Laticínios Porto Alegre)
 - Embalagens de poliéster metalizado e polietileno, 6 cm x 8 cm (TRADBOR Indústria e Comércio LTDA.). Especificações no Anexo I.

- Teste de simulação gastrointestinal:
 - Bile bovina (B3883 – Sigma-Aldrich)
 - Mucina de estômago suíno (M1778 – Sigma-Aldrich)
 - Pancreatina de pâncreas suíno (P1625 – Sigma-Aldrich)
 - Pepsina de mucosa gástrica suína (P7012 – Sigma-Aldrich)

- Contagem do probiótico:
 - Caldo MRS (DIFCO)
 - Ágar MRS (DIFCO)

- Gerador de anaerobiose GasPak™ EZ Anaerobe Container System (Becton, Dickison and Company)

4.2. Métodos

4.2.1. Manutenção e preparo da cultura probiótica para a microencapsulação

A cultura probiótica comercial de *L. acidophilus* (La-5 Christian Hansen) foi utilizada para o desenvolvimento do trabalho. Para sua manutenção, o envelope contendo a cultura foi suspensa em 1 litro de leite desnatado reconstituído 12% p/v autoclavado (121°C/10 minutos), adicionado de 10% p/v de glicerol autoclavado (121°C/15 minutos), à temperatura de 10 °C. Esta mistura foi fracionada em alíquotas de 1 mL adicionadas em tubos *Eppendorf*® e congeladas (-18 °C) até sua utilização. Para a obtenção da suspensão de células da cultura probiótica a ser adicionada a matriz encapsulante, antes de cada experimento tubos congelados foram retirados aleatoriamente para a realização da repicagem do micro-organismo. A cultura foi repicada duas vezes consecutivas em caldo MRS (DIFCO) 1% v/v e incubada a 37°C por 15 horas. Após o crescimento do micro-organismo, a suspensão celular obtida foi transferida para tubos de centrífuga de polipropileno, com tampas rosqueáveis, previamente autoclavados (121°C/15 minutos) e seguiram para centrifugação (Centrífuga Sorvall Instruments RC5C – DUPONT) a 3000 x *g* por 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi descartado e realizou-se a lavagem do concentrado celular por duas vezes consecutivas com água peptonada 0,1% p/v, com posterior descarte do sobrenadante e centrifugação nas mesmas condições acima citadas. Após a segunda lavagem, o concentrado celular foi ressuspenso em água peptonada 0,1% p/v em volume. Uma alíquota de 1% v/v do concentrado celular

ressuspenso foi adicionada a cada matriz encapsulante, que foram em sequência submetidas à microencapsulação por *spray-drying*.

4.2.2. Produção das microcápsulas probióticas

Leite desnatado reconstituído e soro doce reconstituído foram as duas matérias-primas utilizadas como material encapsulante. A Figura 4 apresenta o fluxograma geral de produção de microcápsulas de leite desnatado e soro doce, com a indicação dos pontos de amostragem.

Para o preparo da matriz encapsulante, as matérias-primas foram assepticamente adicionadas a frascos com tampa rosqueável SCHOTT® DURAN® contendo água estéril (121°C/15 minutos), para a obtenção de duas soluções distintas de 1,5 L, contendo 30% de sólidos totais cada. As soluções foram mantidas sob agitação em agitadores magnéticos por 30 minutos para hidratação do pó. Após esse período, foi adicionado 1% v/v de suspensão de células de *Lactobacillus acidophilus* La-5 a cada solução.

Em seguida, as soluções de soro e leite desnatado foram pulverizadas para secagem e microencapsulação do *L. acidophilus* La-5, utilizando-se o *spray-dryer* de escala laboratorial *Lab-Plant SD-05* (Lab-Plant, Huddersfield, UK), conforme os parâmetros descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Condições de microencapsulação do La-5 no *spray-dryer* Lab-Plant SD-05 (Lab-Plant, Huddersfield, UK).

Parâmetros	Condições
Temperatura de entrada (°C)	180
Temperatura de saída (°C)	85-95
Pressão de ar (kgf/cm ²)	5,0
Taxa de fluxo (mL/min)	8
Diâmetro do <i>nozzle</i> (mm)	1,5

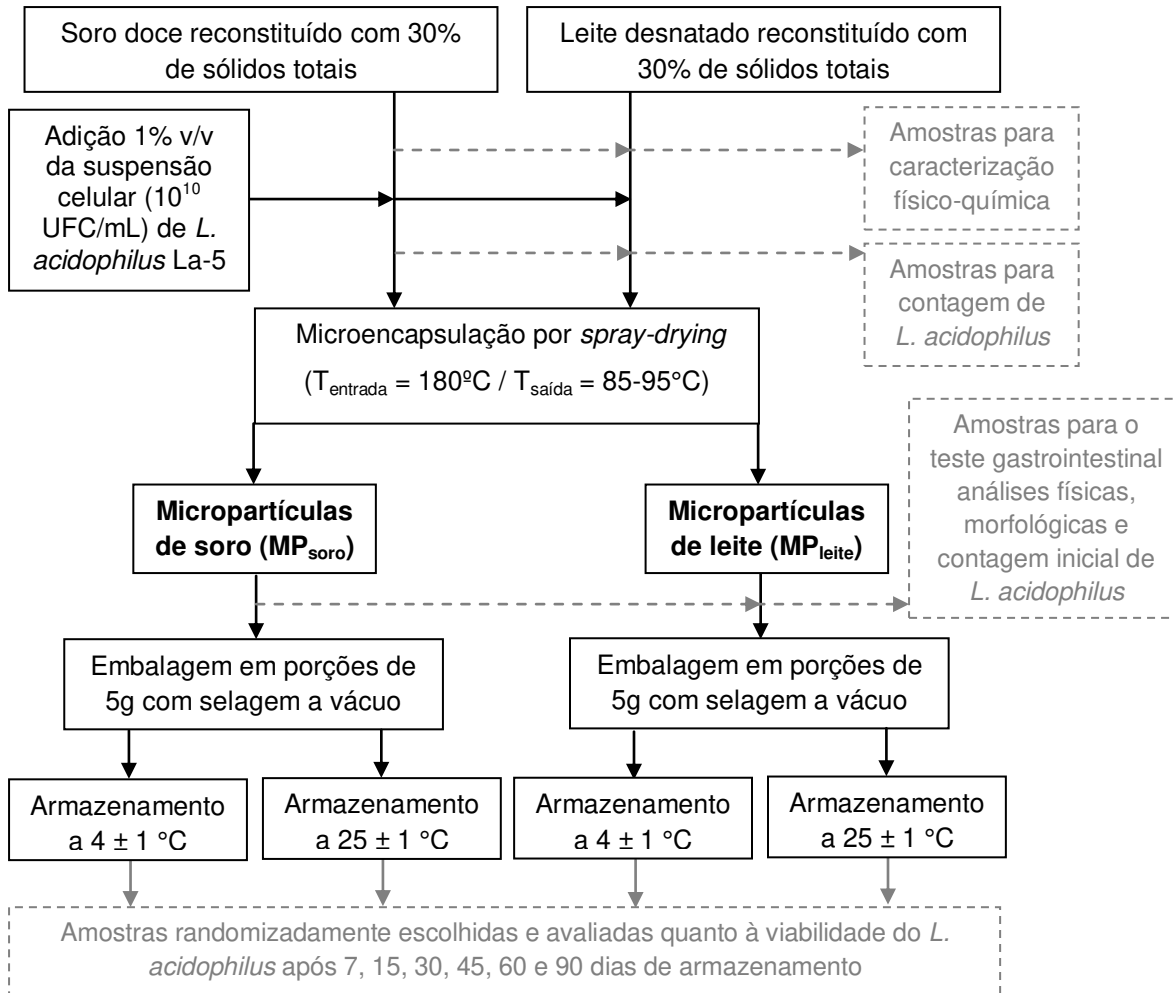


Figura 4. Fluxograma geral de produção de micropartículas probióticas de soro e leite desnatado.

Ao final da secagem obtiveram-se dois produtos distintos: micropartículas de soro (MP_{soro}) e micropartículas de leite desnatado (MP_{leite}). Porções de 5 g dos pós foram acondicionadas em embalagens metálicas compostas de uma camada externa de poliéster metalizado e uma camada de polietileno, e embalados a vácuo assepticamente. Este material é comumente utilizado na indústria para embalagem de leite em pó, e a metalização dessa embalagem tem como propósito a proteção contra a umidade e o oxigênio (JAIME et al., 2008). Depois

de embalados, ambos pós foram armazenados em dessecadores contendo sílica gel e mantidos em estufas a 4 ± 1 e 25 ± 1 °C, conforme apresentado na Figura 5.



Figura 5. Armazenamento das micropartículas probióticas. A: Estufa; B: Dessecador com sílica gel; C: Embalagem de poliéster metalizado e polietileno selada a vácuo.

4.3. Amostragem e análises físico-químicas e morfológicas realizadas

Uma amostra representativa dos lotes adquiridos de leite em pó desnatado e soro doce em pó, assim como uma amostra das soluções reconstituídas de leite desnatado (30% ST) e soro doce (30% ST), preparadas para cada processamento, foram analisadas quanto ao pH, acidez titulável, extrato seco total, cinzas, proteína total, gordura e teor de lactose calculada por diferença. As micropartículas recém produzidas por *spray-drying* foram analisados quanto a umidade, tamanho de partícula, atividade de água (a_w), contagem do *L*.

acidophilus e resistência ao trato gastrointestinal simulado. Após 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias de armazenamento a 4 ± 1 e 25 ± 1 °C as partículas (MP_{soro} e MP_{leite}) foram analisadas quanto a a_w e contagem do probiótico. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.4. Determinações Analíticas

4.4.1. Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram conduzidas segundo as descrições da AOAC (1995) e estão apresentados na Tabela 3. A atividade de água foi determinada utilizando o equipamento AQUALAB - Decagon Devices, Pullman/WA conforme recomendado pelo fabricante.

Tabela 3. Descrição das análises físico-químicas realizadas segundo a AOAC (1995).

Análise	Descrição
pH	Determinado por potenciômetro previamente calibrado, introduzindo o eletrodo diretamente nas amostras homogeneizadas.
Acidez titulável	Determinada pela titulação das amostras com hidróxido de sódio N/9 presença do indicador fenolftaleína até a observação do ponto de viragem.
Extrato seco total (EST)	Determinado por secagem em estufa a 105°C por 16 horas.
Cinzas	Determinado por incineração das amostras em forno mufla a 550°C.
Proteína total	Determinada pelo método macro-Kjeldahl, sendo a determinação da proteína total calculada multiplicando-se a porcentagem de nitrogênio total pelo fator de correção igual a 6,38.
Gordura	Determinada por gravimetria após extração em frascos de Mojonnier

4.4.2. Análises microbiológicas

A viabilidade do *L. acidophilus* na suspensão celular e nas soluções encapsulantes de soro ou leite desnatado foram determinadas por meio da contagem de células viáveis logo após sua produção. A viabilidade do *L. acidophilus* nas micropartículas foi determinada por meio da contagem de células viáveis imediatamente após a produção das partículas por spray-drying (tempo zero) e após 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias de armazenamento a 4 ± 1 e 25 ± 1 °C.

Para esta avaliação, 1 mL de suspensão celular, 1 mL da solução de soro ou leite desnatado ou 1g de pó foi adicionado a 9 mL de água salina peptonada (pH $7,2 \pm 0,02$) e agitado vigorosamente por 1 minuto. Após agitação a solução foi deixada em repouso em temperatura ambiente por 20 minutos para reconstituição do pó. Em seguida, foram realizadas diluições sucessivas em água salina peptonada (pH $7,2 \pm 0,02$), seguida de plaqueamento em profundidade em placas de Petri com ágar MRS. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C em jarras de anaerobiose, adicionadas de gerador de anaerobiose (GasPak™ EZ). Após 72 horas de incubação, foi realizada a contagem das colônias.

A partir das contagens calculou-se a eficiência ou rendimento de encapsulação (RE), que mensura a taxa de sobrevivência ao processo de imobilização, calculada segundo Reddy et al. (2009):

$$RE = (\log N / \log N_0) \times 100$$

Onde: RE é o rendimento de encapsulação, expresso em porcentagem; N_0 é o número de células viáveis (UFC/mL) na matriz encapsulante antes da secagem e N é o número de células viáveis (UFC/g) no pó.

4.4.3. Análises métricas e morfológicas

O diâmetro médio e a distribuição do tamanho das partículas foram avaliados pelo analisador de tamanho de partículas Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltda), utilizando-se álcool etílico absoluto como meio dispersor, conforme descrito por Zhao et al. (2007).

Para a avaliação da microestrutura das partículas, as amostras foram pulverizadas sobre a fita adesiva condutora (cobre), já previamente fixada em *stubs* de alumínio (1 cm x 1 cm), e recobertas com ouro por meio de um evaporador Baltzer (BaltecSCD50, Áustria). As amostras foram posteriormente avaliadas em microscópio eletrônico de varredura (Scanning Microscope JSM-5800LV, Jeol) com aceleração de voltagem de 20 kV (SOUZA, 1998).

4.5. Avaliação da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado durante a simulação das condições gastrointestinais

4.5.1. Preparo do suco gástrico artificial e suco intestinal artificial

Os sucos gástrico e intestinal artificiais e a solução de bile foram preparados segundo Picot e Lacroix (2004a) e Mozzi et. al (2009), com modificações. O suco gástrico artificial (SGA) foi formulado com cloreto de cálcio (0,11 g/L), cloreto de potássio (1,12 g/L), cloreto de sódio (2,0 g/L) e hidrogenofosfato de potássio (0,4 g/L), sendo em seguida autoclavado a 121°C/15 min. Imediatamente antes da sua utilização, o SGA foi adicionado de mucina (3,5 g/L) e pepsina (0,26 g/L) de origem suína e o pH ajustado para 2,0 com HCl 1N.

O suco intestinal artificial (SIA) foi obtido através da adição de solução de pancreatina ao SGA para obtenção da concentração final de 1,95g/L, tendo em seguida seu pH ajustado para 7,0 com adição de NaHCO₃ 1N.

4.5.2. Simulação das condições gastrointestinais

A metodologia descrita por Tenório (2012) foi utilizada para a avaliação da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* La-5 livre e após sua microencapsulação em leite desnatado e soro doce durante a simulação das condições intestinais.

Em três tubos de ensaio diferentes foram adicionados três gramas de MP_{soro}, três gramas de MP_{leite} e três mililitros de suspensão celular (microorganismo livre), respectivamente, contendo 30 mL de SGA (pH 2,0) cada, e incubados em um banho-maria metabólico a 37°C sob agitação. A viabilidade foi avaliada nos intervalos de tempo de 0, 60 e 120 minutos de exposição ao SGA. Decorridos 120 minutos de simulação gástrica, uma solução de pancreatina (1,95 g.L⁻¹) foi adicionada aos tubos e o pH foi ajustado para 7,0, dando início a fase de simulação intestinal. A viabilidade foi novamente avaliada após decorridos 300 minutos de contato com a SIA (TENÓRIO, 2012). A contagem de células viáveis foi realizada conforme descrito no item 4.4.2.

4.6. Delineamento experimental e análise estatística dos dados

O efeito dos tratamentos, ou seja, das duas matrizes encapsulantes, sobre as características físicas da cápsula (umidade, atividade de água e tamanho de partícula) e sobre o rendimento de encapsulação foi avaliado por Análise de variância (ANOVA) e por Teste de Tukey a 5% de significância.

Para a avaliação dos dados de viabilidade do *L. acidophilus* La-5 ao longo do armazenamento, foi montado um esquema fatorial 2 x 2 x 7, em blocos

inteiramente casualizados. O fator primário foi a matriz encapsulante, com dois níveis de variação: leite desnatado e soro; o fator secundário foi a temperatura de armazenamento com dois níveis de variação: 4 ± 1 e $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; o terceiro fator foi o tempo de armazenamento das microcápsulas com sete níveis de variação: 0, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias. O efeito dos fatores e de suas interações foi avaliado por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de significância.

Para a avaliação dos dados de sobrevivência do *L. acidophilus* La-5 à simulação gastrointestinal, foi montado um esquema fatorial 3 x 4, em blocos inteiramente casualizados. O fator primário foi o tratamento, com 3 níveis de variação: livre; micropartículas de soro e micropartículas de leite; o fator secundário foi o tempo de exposição aos sucos gastrointestinais artificiais, com 4 níveis de variação: 0, 60, 120 e 300 minutos. O efeito dos fatores e de suas interações foi avaliado por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização físico-química das matérias-primas e soluções encapsulantes

O soro doce utilizado no preparo da solução encapsulante apresentou a seguinte composição físico-química: $3,7 \pm 0,05$ % de umidade; $13,74 \pm 0,01$ % de proteína; $1,64 \pm 0,01$ % de gordura; $73,88 \pm 0,10$ % de lactose; $7,03 \pm 0,02$ % de cinzas; $0,26 \pm 0,00$ % de ácido láctico e pH 6,42. A composição do leite desnatado utilizado para preparar a solução encapsulante foi a seguinte: $4,3 \pm 0,00$ % de umidade; $32,09 \pm 0,04$ % de proteína; $1,31 \pm 0,01$ % de gordura; $53,20 \pm 0,39$ % de lactose; $9,12 \pm 0,01$ % de cinzas; $0,21 \pm 0,00$ % de ácido láctico e pH 6,70.

A composição físico-química de ambas as soluções de material encapsulante utilizadas para a microencapsulação do *Lactobacillus acidophilus* La-5 estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Composição físico-química das soluções de material encapsulante (n=3).

Composição	Solução de Soro Doce	Solução de Leite Desnatado
Sólidos totais (%)	$29,9 \pm 0,14$	$30,19 \pm 0,31$
Proteína (%)	$3,86 \pm 0,03$	$9,80 \pm 0,03$
Gordura (%)	$0,64 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,03$
Lactose (%)	$23,24 \pm 0,12$	$16,75 \pm 0,40$
Cinzas (%)	$2,16 \pm 0,08$	$3,23 \pm 0,09$
Acidez (% ácido láctico)	$0,26 \pm 0,00$	$0,19 \pm 0,01$
pH	$6,41 \pm 0,02$	$6,7 \pm 0,00$

A diferença de composição entre as soluções de leite desnatado e soro é condizente com a diferença apresentada pelas matérias primas utilizadas para os

seus preparos, com menor teor de proteína e maior teor de lactose para a solução de soro doce com 30% ST.

5.2. Avaliação das características das microcápsulas de leite desnatado e soro doce e do rendimento de encapsulação

Observa-se na Tabela 5 que o material encapsulante não afetou significativamente a umidade, a atividade de água (a_w), o tamanho de partícula e o rendimento de encapsulação.

Tabela 5. Características físico-químicas e rendimento de encapsulação das microcápsulas de soro e leite desnatado.

Características	MP _{soro} ¹	MP _{leite} ²	P
Teor de umidade (%)	4,79 ± 0,1 ^a	4,28 ± 0,2 ^a	0,105
Atividade de água (a_w)	0,20 ± 0,0 ^a	0,15 ± 0,0 ^a	**
Tamanho (µm)	13,02 ± 0,8 ^a	12,86 ± 0,03 ^a	0,821
Rendimento de Encapsulação (%)	82,3 ± 6,3 ^a	79,85 ± 4,3 ^b	0,254

¹MP_{soro}: micropartículas de soro; ²MP_{leite}: micropartículas de leite. **Denominador do teste de F é zero, indicando que não houveram diferenças entre os dados; ^{a, b} Médias com a mesma letra na linha não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

A atividade de água e umidade média das micropartículas produzidas neste estudo, 0,17 e 4,53% respectivamente, encontram-se abaixo de 0,25 e 5,0%, que é desejável para a prevenção da morte celular durante o armazenamento de culturas secas (CHÁVEZ e LEDEBOER, 2007; SANTIVARANGKNA e FOERST, 2008a; PEIGHAMBARDUST et al., 2011). Do ponto de vista físico-químico, para leite em pó desnatado e soro em pó, o teor máximo de umidade desejável é de 4,0 e 3,0%. Essa especificação é definida em relação à a_w , que deve ser próxima a 0,2 a 25°C para ótima preservação desses produtos em temperatura ambiente, e previne defeitos

como o empedramento (STUCK, 2011). O diâmetro médio das micropartículas foi de $12,94 \pm 0,78 \mu\text{m}$. Informações mais detalhadas acerca da análise de tamanho das partículas estão presentes no Anexo I. De maneira similar, De Castro-Cislaghi et al. (2012) produziram partículas de soro por *spray-drying* com $11,2 \mu\text{m}$ de diâmetro médio. Estes valores se encontram dentro do diâmetro médio de partículas de soro e leite em pó desnatado obtidas por *spray-drying*, que apresentam em geral diâmetro entre 10 e $250 \mu\text{m}$. Partículas de menores tamanhos estão relacionadas à maior pressão de atomização e menor viscosidade do líquido alimentador (SHUCK, 2011).

Fatores relatados por outros autores que podem afetar a umidade, a atividade de água e o diâmetro médio das partículas produzidas por *spray-drying* são as condições de secagem (temperatura de entrada/saída e tempo de permanência da partícula), o teor de sólidos da solução encapsulante e o desenho e diâmetro do atomizador, que no presente estudo foram constantes (DESMOND et al., 2002; CORCORAN et al., 2004; ANANTA et al., 2005; FU e CHEN, 2011).

O rendimento de encapsulação médio foi de $81,1 \pm 5,0\%$ após processo de produção de micropartículas por *spray-drying* ($T_{\text{entrada}} = 180^{\circ}\text{C}/T_{\text{saída}} = 85\text{-}95^{\circ}\text{C}$). A viabilidade do micro-organismo foi reduzida em $1,67 \log \text{UFC/g}$ em relação a contagem média das matrizes encapsulantes inoculadas com 1% v/v, que apresentaram $8,85 \log \text{UFC/mL}$. Valores de sobrevivência do *L. acidophilus* La-5 a microencapsulação por *spray-drying* semelhantes ao encontrado neste trabalho já foram relatadas na literatura para diferentes matrizes encapsulantes. Fávaro-Trindade e Grosso (2002) observaram 79% de sobrevivência para o *L. acidophilus* La-5 microencapsulado em celulose acetato ftalato. Zhao et al. (2008) apresentaram rendimento de 81,3% ao microencapsularem *L. acidophilus* XH1 utilizando solução de β -ciclodextrina e goma acácia (9:1). Este rendimento de encapsulação também é similar aos apresentados por Riveros et al. (2009) que, ao trabalharem com permeado de soro como matriz encapsulante, obtiveram

rendimento de encapsulação médio de 80,5%, ao secarem uma linhagem de *L. acidophilus* de origem vaginal.

Os fatores que afetam o rendimento de encapsulação por *spray-drying* de uma mesma linhagem são relacionados ao estágio fisiológico do micro-organismo, as condições de secagem (temperatura de entrada/saída e tempo de permanência da partícula), o teor de sólidos e composição do material encapsulante (GARDINER et al., 2000; RODRÍGUEZ-HUERZO et al., 2007; ZHAO et al., 2008, PAÉZ et al., 2012). A proteção oferecida pelo soro e pelo leite à secagem de bactérias por *spray-drying* parece estar relacionada ao efeito protetor dos componentes dessa matéria prima à parede celular, principalmente a lactose e proteínas (MORGAN et al., 2006; FU e CHEN, 2011). Conforme apresentado na Tabela 4, a matriz de leite desnatado apresentou maior teor de proteínas que a matriz de soro, e a matriz de soro apresentou maior teor de lactose que a matriz de leite desnatado (Tabela 4). Essa diferença não afetou o rendimento de encapsulação, sugerindo que possa ter havido um efeito compensatório entre lactose e proteína quanto à proteção ao probiótico durante a secagem. Buitink et al. (2000) sugerem que a característica vítrea dos açúcares, considerado principal protetor da membrana bacteriana durante a secagem, pode ser afetada por polipeptídios. Além disso, as proteínas são mais estáveis a temperaturas maiores que suas temperaturas de transição vítrea (T_g) que os açúcares.

As Figuras 6 e 7 correspondem à microscopia eletrônica de varredura das micropartículas produzidas por *spray-drying*. É possível visualizar que ambas as partículas de leite e soro apresentam ar ocluso em um vacúolo central, ou pequenos vacúolos distribuídos no interior das partículas que, em geral, possuem concavidades típicas de partículas obtidas por essa técnica (NIJDAM e LANGRISH, 2005). Segundo Lian et al. (2002), a extensão da formação dessas concavidades é dependente da composição da solução encapsulante.

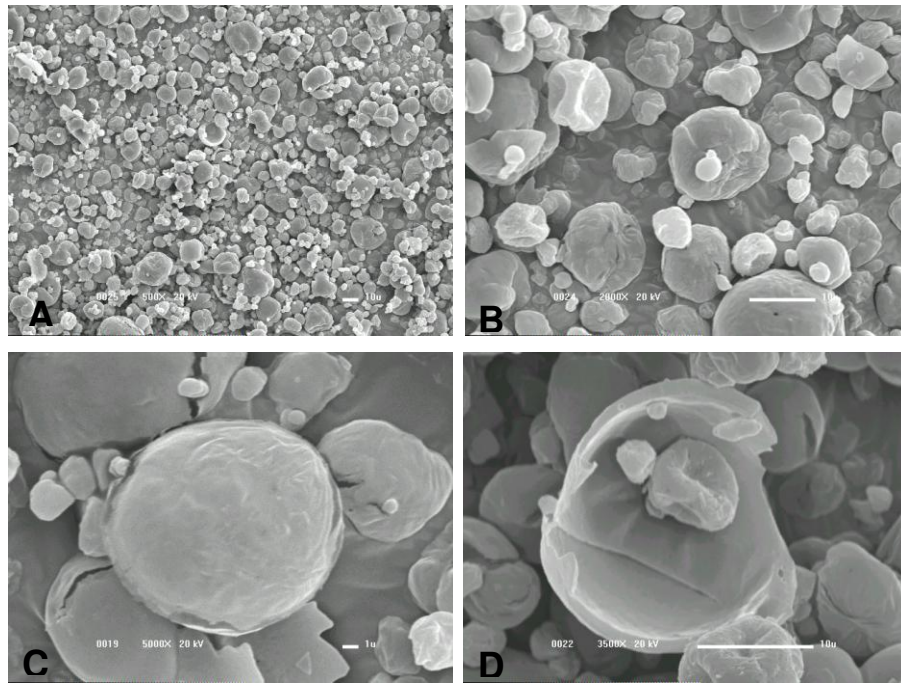


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de soro. A: Aumento 500x. Barra = 10 µm; B: Aumento 2000x, Barra = 10 µm. C: Aumento 5000x. Barra = 1 µm. D: Aumento 3500x. Barra = 10 µm.

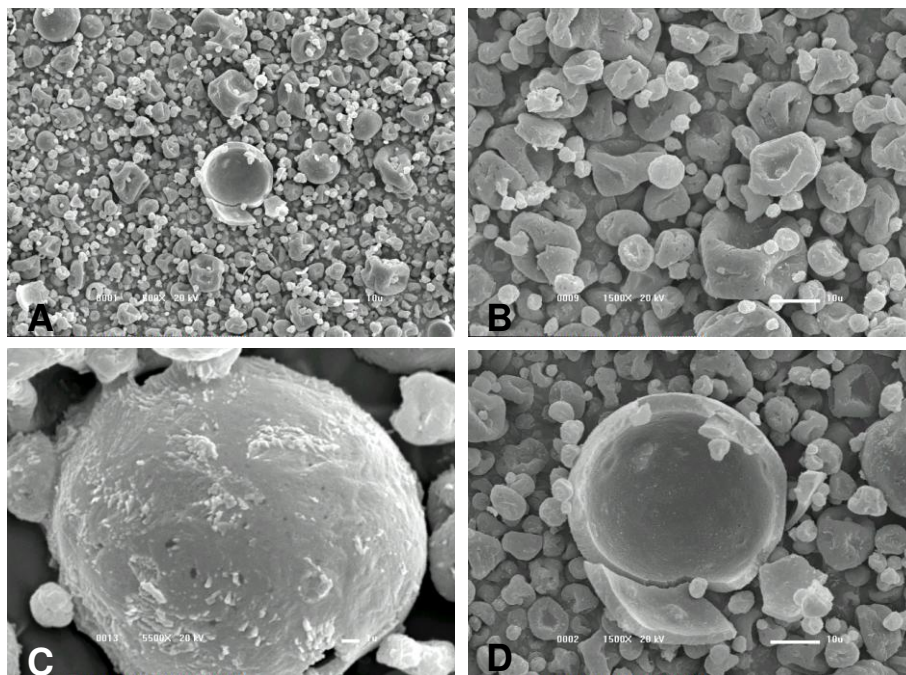


Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de leite desnatado. A: Aumento 500x. Barra = 10 µm. B: Aumento 1500x. Barra = 10 µm. C: Aumento 5500x. Barra = 1 µm. D: Aumento 5500x. Barra = 10 µm.

5.3 Avaliação da sobrevivência do *Lactobacillus acidophilus* La-5 durante o armazenamento

A Figura 8 apresenta a viabilidade do *L. acidophilus* La-5 microencapsulado em soro e leite desnatado durante os 90 dias de armazenamento a $4 \pm 1,0$ e $25 \pm 1,0^\circ\text{C}$. Observa-se na Tabela 6 que os tratamentos, ou seja, a secagem do *L. acidophilus* utilizando leite desnatado ou soro como matriz encapsulante, a temperatura de armazenamento ($4 \pm 1,0$ e $25 \pm 1,0^\circ\text{C}$) e o tempo de armazenamento (90 dias) afetaram significativamente a viabilidade do *L. acidophilus*. No entanto, a interação de qualquer um destes fatores não afetou a sobrevivência do micro-organismo. As contagens microbiológicas das MP_{soro} e MP_{leite} ao longo dos 90 dias de armazenamento a 4°C e 25°C estão apresentadas no Anexo I.

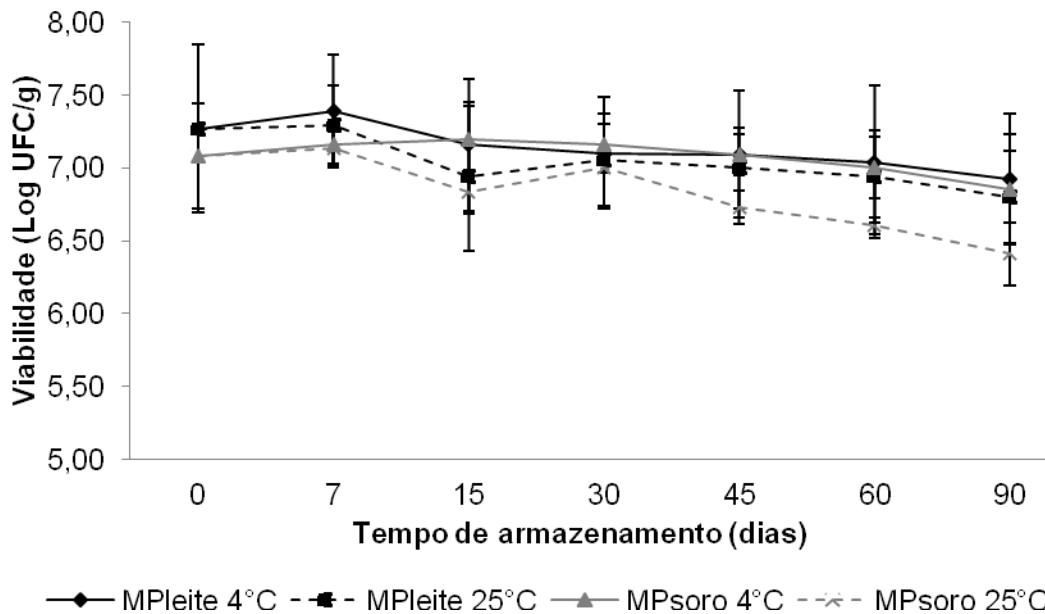


Figura 8. Viabilidade (log UFC/g) do *L. acidophilus* La-5 em micropartículas de leite desnatado (MP_{leite}) e soro (MP_{soro}) ao longo do armazenamento a 4°C e 25°C (n=3).

Devido a baixa variabilidade apresentado pelos dados de atividade de água (a_w) das micropartículas, apresentadas no Anexo I, não foi possível o cálculo do teste F, visto que seu denominador (média dos quadrados dos resíduos) foi zero, indicando que não houve diferença nos seus valores ao longo do tempo. A a_w se manteve em média 0,19 durante os 90 dias de armazenamento, para ambas as partículas e temperaturas de armazenamento. As embalagens de poliéster metalizado revestidas com polietileno e o armazenamento em dessecadores foram eficientes na manutenção da a_w das micropartículas, mantendo a a_w menor que 0,25, que é considerado ideal na manutenção da viabilidade de bactérias lácticas ao longo do armazenamento (FU e CHEN, 2011; PEIGHAMBARDOUST et al., 2011; SILVA et al., 2011).

Tabela 6. Resumo da Análise de Variância (ANOVA). Efeito do tratamento, temperatura e tempo e interação tratamento x temperatura, tratamento x tempo, temperatura x tempo e tratamento x temperatura x tempo sobre a viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* La-5 (n=3).

Fator de variação	Valores p	
	Graus de Liberdade	Sobrevivência
Tratamento*	1	0,029
Temperatura **	1	0,007
Tempo ***	6	0,001
Tratamento x Temperatura	1	0,220
Tratamento x Tempo	6	0,938
Temperatura x Tempo	6	0,785
Trat. x Temp. x Tempo	6	0,968

*Tratamento: micropartículas de leite desnatado (MP_{leite}); micropartículas de soro (MP_{soro}).

Temperatura: 4 e 25°C. *Tempo: 0, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias de armazenamento

A viabilidade do *L. acidophilus* La-5 nas MP_{soro} foi significativamente menor que nas MP_{leite}, apresentando contagem média de $6,95 \pm 0,24$ log UFC/g contra $7,09 \pm 0,17$ log UFC/g. A 4°C as microcápsulas apresentaram contagem média do probiótico de $7,11 \pm 0,24$ log UFC/g, significativamente maior que a médias das microcápsulas armazenadas a 25°C, que foi $6,94 \pm 0,13$ log UFC/g. O efeito do tempo de armazenamento na viabilidade em log UFC/g do *L. acidophilus* La- 5 está apresentado na Figura 9. A viabilidade do *L. acidophilus* decresceu significativamente durante os 90 dias armazenamento, apresentando uma redução de 0,43 log UFC/g ao final deste período. Esta redução foi menor que uma redução decimal e, do ponto de vista microbiológico, pode ser considerada baixa. Mesmo após os 90 dias de armazenamento, as micropartículas apresentaram contagens superiores a 10^6 UFC/g, que é considerado o valor mínimo presente em um alimento para que possam desempenhar seu efeito probiótico (HAMILTON-MILLER et al., 1999; REID et al., 2003).

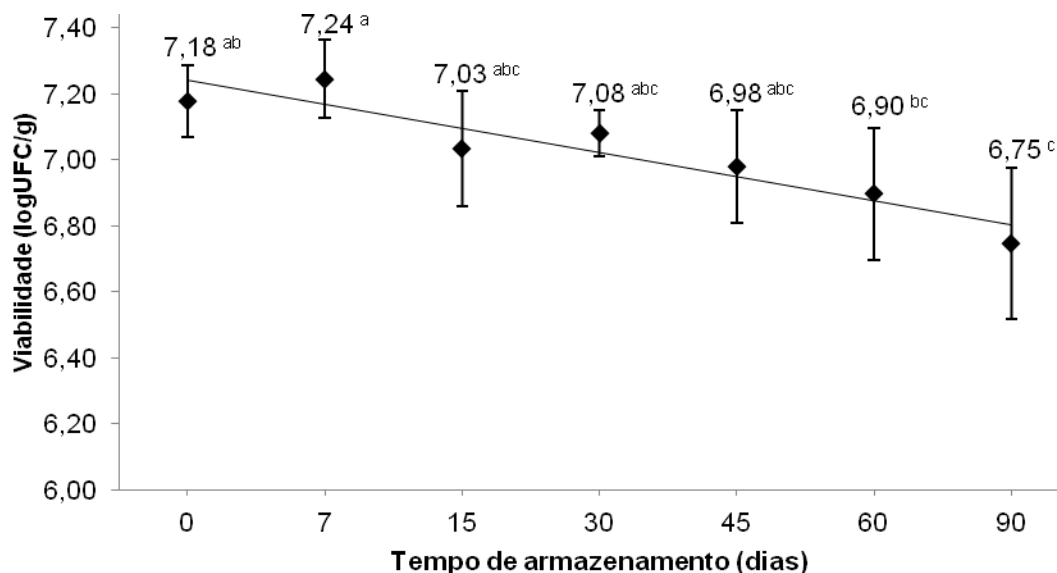


Figura 9. Efeito do tempo de armazenamento na viabilidade (log UFC/g) do *Lactobacillus acidophilus* La-5. ^{a,b,c} Para cada tempo, médias precedidas da mesma letra não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

Altas contagens foram observadas por Abe et al. (2009), que relataram contagens maiores que 10^7 ao final de 24 meses para diferentes espécies de bifidobactérias, em fórmulas lácteas em pó. Schuck et al. (2012) observaram contagens superiores a 10^7 UFC/g ao final de aproximadamente 3 anos de armazenamento para duas linhagens de *Propionibacterium acidipropionici* em permeado de soro em pó. Em contraste, Golowczyc et al. (2010) e Paéz et al. (2012) relataram contagens menores que 10^6 UFC/g para diferentes linhagens de *L. acidophilus*, *L. plantarum* e *Saccharomycopsis lipolytica* microencapsulados em leite desnatado ao final de 80 dias de armazenamento.

As contagens maiores que 10^6 UFC/g após 90 dias de armazenamento, apresentadas neste trabalho, podem ser atribuídas tanto às características de resistência intrínsecas desta linhagem, quanto à semelhança de umidade, a_w , e ao tamanho das micropartículas produzidas, que não diferiram significativamente entre si. Sugere-se então que a embalagem utilizada apresentou barreira à umidade, visto que não houve na variação na a_w ao longo do tempo de armazenamento, e ao oxigênio, que, juntamente com a selagem a vácuo, contribuíram para a minimização do nível de oxigênio no interior das embalagens. A baixa a_w e o baixo nível de oxigênio na embalagem podem minimizar a formação de radicais livres que ocorre principalmente pela oxidação de lipídeos da membrana celular. Esses radicais livres, quando se difundem para o interior da célula podem induzir danos ao DNA celular, causando sua morte. No entanto, a difusão de oxigênio para a membrana celular pode ser também minimizada pelo estado amorfo de carboidratos, como a lactose, em pós armazenados em ambiente com baixa atividade de água ($< 0,3$), como promovido neste estudo. Este fato prolongaria a viabilidade das bactérias probióticas, favorecendo a sobrevivência do probiótico durante o armazenamento por longos períodos (CHÁVEZ e LEDEBOER, 2007; SANTIVARANGKNA et. Al., 2008).

5.4 Avaliação da resistência do *Lactobacillus acidophilus* La-5 livre e em micropartículas à simulação das condições gastrintestinais

O tratamento, o tempo de exposição e a interação desses fatores afetaram significativamente a sobrevivência do *L. acidophilus* La-5 durante a simulação gastrointestinal, conforme exposto na Tabela 7.

Tabela 7. Resumo da Análise de Variância (ANOVA). Efeito do tratamento, tempo e interação tratamento x tempo sobre a sobrevivência do *Lactobacillus acidophilus* La-5 durante a simulação gastrointestinal (n=3).

Fator de variação	Valores <i>p</i>	
	Graus de Liberdade	Sobrevivência
Tratamento*	2	< 0,0001
Tempo **	3	< 0,0001
Tratamento x Tempo	6	< 0,0001

* Tratamentos: concentrado celular suspenso em água peptonada (Livre), micropartículas de soro (MP_{soro}) e micropartículas de leite desnatado (MP_{leite}).
 Tempo: 0, 60, 120 e 300 minutos de simulação gastrointestinal. *SGI: simulação gastrointestinal (7 horas) = Solução Gástrica Artificial (120min/pH 2,0) + Solução Intestinal Artificial (300min/pH 7,0).

A Figura 9 apresenta sobrevivência do *L. acidophilus* durante incubação sequencial da suspensão celular, das micropartículas de soro (MP_{soro}) e das micropartículas de leite desnatado (MP_{leite}) em suco gástrico artificial (SGA) pH 2,0 por 2 horas e suco intestinal artificial (SIA) pH 7,0 por 5 horas. Observa-se que após 60 minutos de exposição ao SGA não houve redução significativa na viabilidade do micro-organismo livre ou microencapsulado em soro ou leite (MP_{soro} e MP_{leite}). No entanto, ao final das 7 horas de duração da simulação gastrointestinal, o probiótico na forma livre apresentou uma redução significativa de 3,11 ciclos log; o probiótico microencapsulado em soro (MP_{soro}) teve sua sobrevivência mantida enquanto o microencapsulado em leite desnatado teve sua

viabilidade aumentada em 1,64 ciclos log. A recuperação de probióticos ao final da fase de simulação das condições intestinais pode ser atribuída a neutralização do pH (PICOT e LACROIX, 2004). No entanto, a maior recuperação do microorganismo microencapsulado em leite desnatado pode estar relacionada à utilização de peptídeos e aminoácidos advindos da digestão da caseína (BRODY, 2000; BRUCK et al., 2006). Ao final da simulação gastrointestinal, a sobrevivência do *L. acidophilus* microencapsulado (MP_{soro} e MP_{leite}) foi significativamente maior que a sua sobrevivência na forma livre, evidenciando o efeito protetor da microencapsulação em ambas as matrizes.

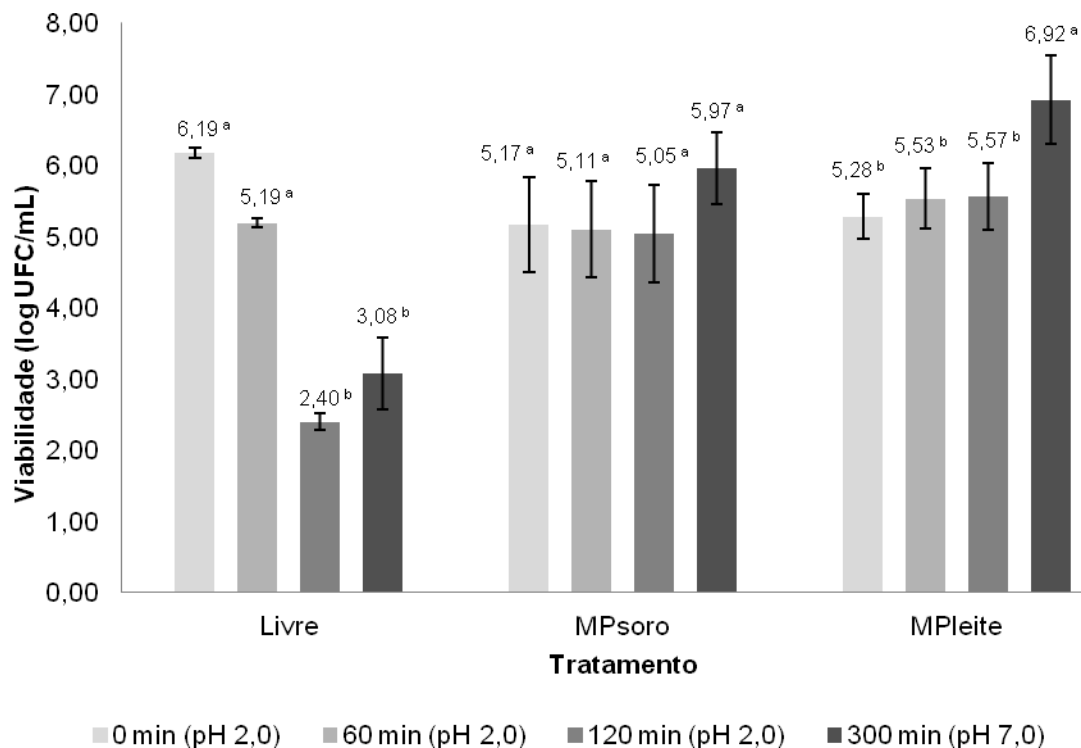


Figura 10. Viabilidade (log UFC/mL) do *Lactobacillus acidophilus* La-5 livre, em micropartículas de soro (MP_{soro}) e em micropartículas de leite desnatado (MP_{leite}) submetidas as condições que simulam o trânsito gastrointestinal. ^{a,b} Para cada tratamento, médias precedidas da mesma letra não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$). ($n=3$).

Estes resultados estão de acordo com os apresentados por Reddy et al. (2009), que observaram 100% de retenção da viabilidade do *L. plantarum* CFR 2158 microencapsulado por *spray-drying* em leite desnatado após 4 horas de exposição ao pH 2,0. De Castro-Cislaghi (2012) também observaram um efeito protetor da microencapsulação. Ao estudarem o efeito da exposição de *Bifidobacterium* Bb-12 ao pH 2,0 por 3 horas, foram encontradas reduções de 1,51 log UFC/g para a bactéria na forma livre contra 0,73 UFC/g quando em microencapsulas de soro produzidas por *spray-drying*.

Face ao apresentado na literatura, a resistência de bactérias probióticas as condições gastrointestinais, além de ser dependente da linhagem bacteriana, parece estar condicionada a técnica de microencapsulação, a adição de substâncias protetoras ou a matriz alimentícia onde estes probióticos são veiculados. Nesse contexto, o leite desnatado, o soro e seus derivados, como o isolado e o concentrado proteico de soro, são apontados como potenciais matérias encapsulantes para a produção de cápsulas com resistência gastrintestinal (LIAN et al. 2003; REDDY et al, 2009; RANADHEERA et al., 2010; GBASSI et al., 2011; PAÈZ et al., 2012).

6. CONCLUSÕES

Ambas as matrizes encapsulantes (soro doce e leite desnatado) não conferiram diferenças quanto ao tamanho das partículas, umidade, atividade de água e rendimento de encapsulação do *L. acidophilus* La-5.

A microencapsulação de *L. acidophilus* La-5 utilizando soro doce e leite desnatado é viável tecnologicamente. As micropartículas produzidas apresentaram populações do probiótico superiores a 10^6 UFC/g por até 90 dias de armazenamento tanto a 4 °C quanto a 25° C, com reduções significativas de apenas 0,43 log UFC/g em média durante este período.

Durante o ensaio de simulação da passagem pelo trato gastrointestinal, ambas as micropartículas promoveram a manutenção da viabilidade do *L. acidophilus* La-5, que foi reduzida em 50% para o probiótico na forma livre. As micropartículas de leite (MP_{leite}) conferiram maior proteção ao probiótico, favorecendo o aumento de sua viabilidade ao final da simulação gastrointestinal.

Os resultados indicam que tanto o leite desnatado quanto o soro, que é uma matéria-prima de baixo custo, são interessantes para a veiculação de culturas probióticas e passíveis de serem armazenadas em temperatura ambiente, sem que haja redução na viabilidade dos micro-organismos quando submetidos à condições que simulem a passagem pelo trato gastrointestinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, F.; MIYAUCHI, H.; UCHIJIMA, A.; YAESHIMA, T.; IWATSUKI, K. Stability of bifidobacteria in powdered formula. **International Journal of Food Science & Technology**. v. 44, n. 4, p. 718–724, 2009.

ANANTA, E.; VOLKERT, M.; KNORR, D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried GG. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 4, p. 399–409, 2005.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. Atualizado em Julho de 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 20/9/2011.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16th ed. Arlington, VA, USA: Association of Analytical Communities, 1995.

BRODY, E. P. Biological activities of bovine glycomacropeptide. **British Journal of Nutrition**. vol. 84, pg 39-46, 2000.

BRUCK, W. M.; REDGRAVE, M.; TUOHY, K. M.; LONNERDAL, B.; GRAVERHOLT, G.; HERNELL, O.; GIBSON, G. R. Effects of Bovine [alpha]-Lactalbumin and Casein Glycomacropeptide-enriched Infant Formulae on Faecal Microbiota in Healthy Term Infants. **Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition**. vol. 43-5, pg. 673-679, 2006.

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

CHAMPAGNE, C. P.; KAILASAPATHY, K. Encapsulation of probiotics. N. Garti (Ed.); **Controlled release technologies for targeted nutrition**. Cambridge, UK: Woodhead Publishing, p.344-369, 2008..

CHÁVEZ, B. E.; LEDEBOER, A. M. Drying of Probiotics: Optimization of Formulation and Process to Enhance Storage Survival. **Drying Technology**, v. 25, n. 7-8, p. 1193–1201, 2007.

CORCORAN, F.; B. M. ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. **Journal of applied microbiology**, v. 96, n. 5, p. 1024-39, 2004.

CROWE, J. H.; OLIVER, A. E.; TABLIN, F. Is there a single biochemical adaptation to anhydrobiosis? **Integrative and comparative biology**, v. 42, n. 3, p. 497–503, 2002.

DE CASTRO-CISLAGHI, F. P.; DOS, C.; SILVA, R. E. et al. Bifidobacterium Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions , tolerance to NaCl , and viability during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 113, n. 2, p. 186–193, 2012.

DEL PIANO, M.; BALLARÈ, M.; ANDERLONI, A.; GARELLO, E.; ORSELLO M.; PAGLIARULO, M.; MORELLI, L.; CAPURS, L. In vitro sensitivity of probiotics to human bile. **Digestive and Liver Disease**. Abstract 38:S130, 2006a.

DEL PIANO, M.; BALLARÈ, M.; ANDERLONI, A.; GARELLO, E.; ORSELLO M.; PAGLIARULO, M.; MORELLI, L.; CAPURS, L. In vitro sensitivity of probiotics to human gastric juice. **Digestive and Liver Disease**. Abstract 38:S134, 2006b.

DEL PIANO, M.; STROZZI, P.; BARBA, M. et al. In Vitro Sensitivity of Probiotics to Human Pancreatic Juice. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 42, sup. 3, part. 2., p. 170–173, 2008.

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.

DESMOND, C.; ROSS, R. P.; O'CALLAGHAN, E.; FITZGERALD, G.; STANTON, C. Improved survival of Lactobacillus paracasei NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. **Journal of applied microbiology**, v. 93, n. 6, p. 1003–11, 2002.

FAO/WHO. **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: 20/9/2011.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of L. acidophilus (La-05) and B. lactis (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. **Journal of microencapsulation**, v. 19, n. 4, p. 485-94, 2002.

FIESP; ITAL. **Brasil Food Trends 2020**. São Paulo, 2010. Disponível em: http://www.brasilfoodtrends.com.br/Brasil_Food_Trends/index.html. Acesso em: 20/9/2011

FOOKS, L. J. FULLER, ROY; GIBSON, GLENN R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 1, p. 53-61, 1999.

FU, N.; CHEN, X. D. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1127-1149, 2011.

FU, W.-Y.; ETZEL, M. R. Spray Drying of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C2 and Cellular Injury. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 1, p. 195–200, 1995.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **The Journal of applied bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365-78, 1989.

GARCÍA, A. H. Anhydrobiosis in bacteria: From physiology to applications. **Journal of Biosciences**. 36(5), p. 939–950, 2011.

GARDINER, G. E. O’SULLIVAN, E. KELLY, J. et al. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2605-12, 2000.

GBASSI, G. K.; VANDAMME, T.; YOLOU, S. F.; MARCHIONI, E. In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. **International Dairy Journal**. Vol. 21-2, p. 97-102, 2011.

GHARSALLAOUI, A. ROUDAUT, G. CHAMBIN, O. VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107-1121, 2007.

GODERSKA, K.; CZARNECKI, Z. Influence of microencapsulation and spray drying on the viability of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **Polish journal of microbiology**, v. 57, n. 2, p. 135-40, 2008.

GOLOWCZYC, M. A.; SILVA, J.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L.; TEIXEIRA, P. Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. **Letters in applied microbiology**, v. 50, n. 1, p. 7–12, 2010.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties

relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science Technology**, v. 10, n. 4-5, p. 139-157, 1999.

GUERRA, A.; ETIENNE-MESMIN, L.; LIVRELLI, V. et al. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 591–600, 2012.

HAMILTON-MILLER, J. M. T.; SHAH, S.; WINKLER, J. T. Public health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. **Public Health Nutrition**, vol. 2, pg. 223-229, 1999.

JAIME, S. B. M.; ITO, D.; MOREIRA, C. Q. Influence of the barrier properties of flexible packaging on whole milk powder stability. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 11, n. 1, p. 46-53, jan./mar. 2008.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 6th ed. Githersburg, MD: Aspen Publishing, Inc., 2000.

JOHNSON, J. A C.; ETZEL, M.R. Properties of Lactobacillus helveticus CNRZ-32 Attenuated by Spray-Drying, Freeze-Drying, or Freezing. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 4, p. 761-768, 1995.

KLAENHAMMER, T. R. Probiotics and prebiotics. M. P. Doyle (Ed.); **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington, D. C.: ASM Press, 2^a ed., p.797-811, 2001..

KNEBEL, P. Tecnologia promove revolução no setor de alimentos. **Jornal do Comércio**, p. 8-9, 12. Porto Alegre , Brasil. set. 2011.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 101, n. 2, p. 229-38; quiz 239-41, 2001.

LIAN, W.-C. HSIAO, H.-C.; CHOU, C.-C. Survival of bifidobacteria after spray-drying. **International journal of food microbiology**, v. 74, n. 1-2, p. 79-86, 2002.

LIAN, W. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 3, p. 293–301, 2003.

LIEVENSE, L. C.; RIET, K. Convective drying of bacteria. **Biotechnics/Wastewater**. Springer Berlin Heidelberg. v. 51, p.71–89, 1994.

MADHU, A. N.; AWASTHI, S. P. Impact of Freeze and Spray Drying on the Retention of Probiotic Properties of *Lactobacillus fermentum*: An in vitro Evaluation Model. **International Journal of Microbiology Research**, v. 2, n. 3, p. 243–251, 2011.

MANOJLOVIĆ, V. NEDOVIC, V. A.; KAILASAPATHY, KASIPATHY. Encapsulation of Probiotics for use in Food Products. N. J. Zuidam; V. Nedovic (Eds.); **Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing**. Springer New York, New York, NY. p.269-302, 2010.

MASSAGUER, P. R. DE. **Microbiologia dos processos alimentares**. il. ed. São Paulo: Varela, 2006.

MASTERS, K. Spray-drying in practice. 464 p., **SprayDryConsult International ApS**, Denmark, 2002,

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

MILES, C.A. Relating cell killing to inactivation of critical components. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, p. 914–917, 2006.

MORGAN, C. A; HERMAN, N.; WHITE, P. A; VESEY, G. Preservation of microorganisms by drying; a review. **Journal of microbiological methods**, v. 66, n. 2, p. 183–93, 2006.

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

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.

NIJDAM, J. J.; LANGRISH, T. A. G. An Investigation of Milk Powders Produced by a Laboratory-Scale Spray Dryer. **Drying Technology**, v. 23, n. 5, p. 1043–1056, 2005.

OLIVEIRA, A C. MORETTI, T. S. BOSCHINI, C. et al. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. **Journal of microencapsulation**, v. 24, n. 7, p. 673-81, 2007.

O'RIORDAN, K. ANDREWS, D. BUCKLE, K.; CONWAY, P. Evaluation of microencapsulation of a Bifidobacterium strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. **Journal of applied microbiology**, v. 91, n. 6, p. 1059-66, 2001.

O'TOOLE, P. W.; COONEY, J. C. Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**. v. 2008, ID 175285, 9 pg., 2008.

PAÉZ, L. R.; LAVARI, G.; VINDEROLA, G.; AUDERO, A.; CUATRIN, N.; ZARITZKY, J.; REINHEIMER. Effect of heat treatment and spray drying on lactobacilli viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. **Food Research International**. Vol. 48-2, p. 748-754, 2012,

PEIGHAMBARDOUST, S. H. GOLSHAN TAFTI, A; HESARI, J. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 5, p. 215-224, 2011.

PICOT, A, LACROIX, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 6, p. 505-515, 2004a.

PICOT, A.; LACROIX, C. Optimization of dynamic loop mixer operating conditions for production of O/W emulsion for cell microencapsulation. **Le Lait**, v. 83, n. 3, p. 237-250, 2004.

PRAKASH, S.; TOMARO-DUCHESNEAU, C.; SAHA, S.; CANTOR, A. The Gut Microbiota and Human Health with an Emphasis on the Use of Microencapsulated Bacterial Cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Artigo ID 981214, 12 p., 2011.

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

REDDY, K. B. P. K.; MADHU, A. N.; PRAPULLA, S. G. Comparative survival and evaluation of functional probiotic properties of spray-dried lactic acid bacteria. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 2, p. 240–248, 2009.

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.

REID, G. Probiotics and prebiotics – Progress and challenges. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 10-11, p. 969-975, 2008.

RIVEROS, B.; FERRER, J.; BÓRQUEZ, R. Spray Drying of a Vaginal Probiotic Strain of *Lactobacillus acidophilus*. **Drying Technology**, v. 27, n. 1, p. 123–132, 2009.

RODRÍGUEZ-HUEZO, M. E.; DURÁN-LUGO, R.; PRADO-BARRAGÁN, L. A. et al. Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. **Food Research International**. v. 40, n. 10, pg. 1299–1306, 2007.

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

ROSS, R. P. DESMOND, C. FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. **Journal of applied microbiology**, v. 98, n. 6, p. 1410-7, 2005.

SANDERS, M. E. GIBSON, G. R. GILL, H. S.; GUARNER, F. Probiotics: their potential to impact human health. **Health San Francisco**, v. 36, n. 36, p. 20, 2007.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. **Biotechnology progress**, v. 23, n. 2, p. 302–15, 2007.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105-1, p. 1–13, 2008a.

SANTIVARANGKNA, C.; HIGL, B.; FOERST, P. Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. **Food microbiology**, v. 25, n. 3, p. 429–41, 2008b.

SCHUCK, P. Milk Powder: Physical and Functional Properties of Milk Powders. **Encyclopedia of Dairy Sciences**. Elsevier. 2^a ed., p. 117–124, 2011.

SCHUCK, P.; DOLIVET, A.; MÉJEAN, S.; HERVÉ, C.; JEANTET, R. Spray drying of dairy bacteria: New opportunities to improve the viability of bacteria powders. **International Dairy Journal**, p. 1–6, 2012.

SILVA, J.; FREIXO, R.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Spray-drying for the production of dried cultures. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 3, p. 321–335, 2011.

SIMPSON, P. J.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P. Intrinsic tolerance of Bifidobacterium species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. **Journal of Applied Microbiology**. n. 2002, p. 493–501, 2005.

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

SUTTON, S. Accuracy of Plate Counts. **Journal of Validation Technology**. v.17, n.3, p. 42–46, 2011.

TENÓRIO, C. G. M. S. C. Microencapsulação de Lactobacillus acidophilus e aplicação em queijo prato. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 147 p., 2012.

TO, B. C. S.; ETZEL, MARK R. Spray Drying, Freeze Drying, or Freezing of Three Different Lactic Acid Bacteria Species. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 3, p. 576-578, 1997.

TRINDADE, C. S. F.; 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. 9, p. 496-499, 2000.

YING, D. Y. PHOON, M. C. SANGUANSRI, L. et al. Microencapsulated Lactobacillus rhamnosus GG powders: relationship of powder physical properties to probiotic survival during storage. **Journal of food science**, v. 75, n. 9, p. E588-95, 2010.

ZAMORA, L. M. Comparative Survival Rates of Lactic Acid Bacteria Isolated from Blood, Following Spray-drying and Freeze-drying. **Food Science and Technology International**, v. 12, n. 1, p. 77–84, 2006.

ZHAO, R. SUN, J. TORLEY, P. WANG, D.; NIU, S. Measurement of particle diameter of Lactobacillus acidophilus microcapsule by spray drying and analysis on its microstructure. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 8, p. 1349-1354, 2007.

ANEXO I

Viabilidade (log UFC/g) do *Lactobacillus acidophilus* em micropartículas de leite desnatado (MP_{leite}) e soro (MP_{soro}) ao longo do armazenamento a 4°C e 25°C (n=3).

Dias de armazenamento	Tratamentos			
	MP _{soro} ¹		MP _{leite} ²	
	4°C	25°C	4°C	25°C
0	7,08 ± 0,36	7,08 ± 0,36	7,27 ± 0,57	7,27 ± 0,57
7	7,16 ± 0,14	7,14 ± 0,11	7,39 ± 0,39	7,29 ± 0,27
15	7,20 ± 0,23	6,83 ± 0,15	7,16 ± 0,45	6,94 ± 0,51
30	7,16 ± 0,14	7,00 ± 0,03	7,10 ± 0,39	7,06 ± 0,32
45	7,09 ± 0,14	6,73 ± 0,11	7,09 ± 0,44	7,00 ± 0,28
60	7,00 ± 0,21	6,61 ± 0,06	7,04 ± 0,52	6,94 ± 0,32
90	6,85 ± 0,37	6,41 ± 0,22	6,92 ± 0,45	6,80 ± 0,32

¹ MP_{soro}: microcápsulas de soro; ² MP_{leite}: microcápsulas de leite desnatado;

Atividade de água (a_w) das micropartículas de leite desnatado e soro ao longo do armazenamento a 4°C e 25°C (n=3).

Dias de armazenamento	Tratamentos			
	MP _{soro} ¹		MP _{leite} ²	
	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C
0	0,20 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,15 ± 0,00
7	0,23 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,15 ± 0,00
15	0,23 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,15 ± 0,00
30	0,23 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,15 ± 0,00
45	0,23 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,15 ± 0,00
60	0,23 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,15 ± 0,00
90	0,23 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,15 ± 0,00

¹ MP_{soro}: microcápsulas de soro; ² MP_{leite}: microcápsulas de leite desnatado;



Especificação Técnica

Revisão. 00 – 30/08/2011

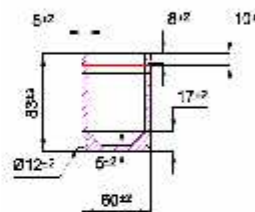
❖ DESCRIÇÃO DA EMBALAGEM

Tradpouch **60 MZ** x (83 x 17) mm

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Transparente | <input checked="" type="checkbox"/> Metalizado |
| <input checked="" type="checkbox"/> Sem Impressão | <input checked="" type="checkbox"/> Com Impressão |
| <input type="checkbox"/> Sem Ziper | <input type="checkbox"/> Com Ziper |
| <input type="checkbox"/> Bico c/ tampa de plástico | |

❖ DIMENSIONAL DA EMBALAGEM

Cota	Esp (mm)	Tolerância (mm)
Largura	60	± 2
Altura	83	± 2
Sanfona	17	± 2



❖ MATÉRIA – PRIMA

- Laminado Metalizado PE 83g, 590,0 mm.

Estrutura	G/m ²		
	Mínimo	Nominal	Máximo
Poliéster metalizado	15,95	16,80	17,65
Adesivo	2,50	2,75	3,00
Pe coex transparente	77,19	83,00	88,81
G/m² Total			
	95,64	102,55	109,46

Resistência à Selagem		Resistência à Delaminação	
Esp. Mín.	Nominal	Esp. Mín.	Nominal
2000,00 gf / pol	2000,00 gf / pol	600,00 gf / pol	600,00 gf / pol

Obs: A matéria – prima é liberada pelo recebimento da Tradbor Ind. Com. Ltda. de acordo com o Certificado de Qualidade emitido pelo fornecedor.

De acordo com a Resolução ANVISA nº. 105 de 19 de maio de 1999 – Disposições Gerais para Embalagens e Equipamentos Plásticos em Contato com Alimentos e seus anexos com as Portarias: RDC nº 17, de 17 de março de 2008 Regulamento Técnico sobre Lista Positiva de Aditivos para Materiais Plásticos destinados à Elaboração de Embalagens e Equipamentos em Contato com Alimentos.

❖ Embalagens aprovadas para entrar em con

Elaborado por: S.G.O.
Aprovado por: Gerência Industrial.



1

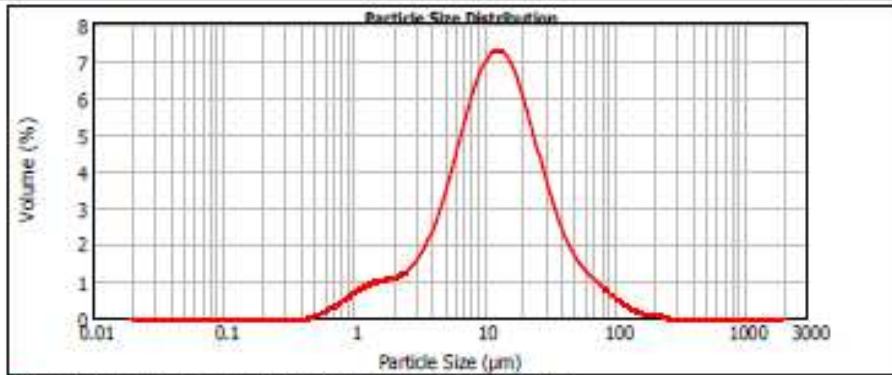


Result Analysis Report

Sample Name: SoróPóProb - Average
Sample Source & type:
Sample bulk lot ref:
SOP Name:
Measured by: Guilherme DTA
Result Source: Averaged
Measured: quinta-feira, 23 de agosto de 2012 10:17:45
Analysed: quinta-feira, 23 de agosto de 2012 10:17:47

Particle Name: Fraunhofer
Particle RI: 0.000
Dispersant Name: Ethanol
Concentration: 0.0134 %Vol
Specific Surface Area: 0.878 m²/g
Accessory Name: Hydro 2000S (A)
Absorption: 0
Dispersant RI: 1.360
Span : 2.805
Surface Weighted Mean D[3,2]: 6.836 um
Analysis model: General purpose (spherical)
Size range: 0.020 to 2000.000 um
Weighted Residual: 0.404 %
Uniformity: 0.944
Vol. Weighted Mean D[4,3]: 15.135 um
Sensitivity: Normal
Obscuration: 12.88 %
Result Emulation: Off
Result units: Volume

d(0.1): 3.298 um d(0.5): 12.217 um d(0.9): 37.968 um



--- SoróPóProb - Average, quinta-feira, 23 de agosto de 2012 10:17:45

Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)
0.020	0.00	0.150	0.00	1.250	0.04	10.000	6.40	75.420	0.00	630.000	0.00
0.025	0.00	0.160	0.00	1.400	0.00	11.400	0.01	81.200	0.04	724.000	0.00
0.030	0.00	0.200	0.00	1.600	0.00	13.100	0.00	104.710	0.04	921.750	0.00
0.040	0.00	0.250	0.00	1.800	0.00	15.100	0.00	130.200	0.00	1164.900	0.00
0.050	0.00	0.300	0.00	2.100	0.00	17.310	0.01	160.000	0.01	1464.410	0.00
0.060	0.00	0.350	0.00	2.510	1.01	19.900	0.10	190.400	0.10	1850.000	0.00
0.080	0.00	0.400	0.00	2.990	1.40	22.900	0.15	241.000	0.10	2340.000	0.00
0.100	0.00	0.450	0.00	3.510	1.70	26.300	0.09	290.000	0.00	2850.000	0.00
0.120	0.00	0.500	0.00	4.000	2.21	30.000	0.01	340.000	0.00	3360.000	0.00
0.150	0.00	0.550	0.10	4.500	2.70	34.000	1.40	390.000	0.00	3870.000	0.00
0.200	0.00	0.600	0.20	5.010	3.41	38.000	1.90	440.000	0.00	4380.000	0.00
0.250	0.00	0.650	0.37	5.500	4.11	42.000	1.90	490.000	0.00	4890.000	0.00
0.300	0.00	0.700	0.50	6.000	4.91	46.000	1.20	540.000	0.00	5400.000	0.00
0.350	0.00	0.750	0.60	6.510	5.80	50.100	1.00	590.000	0.00	5910.000	0.00
0.400	0.00	0.800	0.75	7.000	6.80	54.000	0.87	640.000	0.00	6420.000	0.00

Operator note:



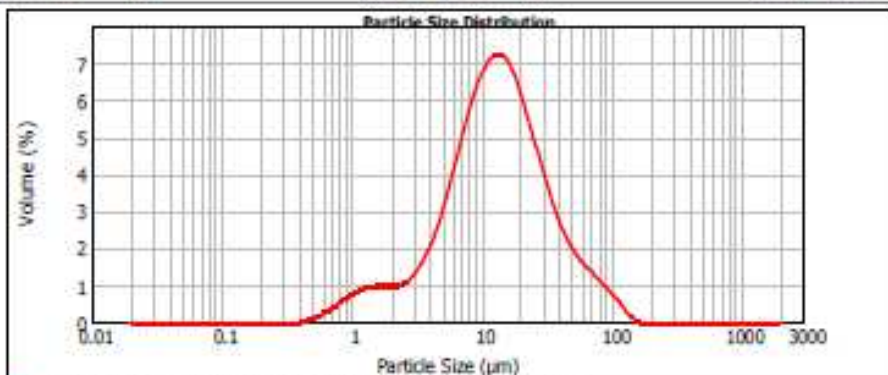
Result Analysis Report

Sample Name: SoroP6Prob2 - Average
Sample Source & type:
Sample bulk lot ref:
SOP Name:
Measured by: Guilherme DTA
Result Source: Averaged
Measured: quinta-feira, 23 de agosto de 2012 10:23:00
Analysed: quinta-feira, 23 de agosto de 2012 10:23:01

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
Obcuration: 5.83 %
Dispersant Name: Ethanol
Dispersant RI: 1.360
Weighted Residual: 0.522 %
Result Emulation: Off

Concentration: 0.0059 %Vol
Span : 2.923
Uniformity: 0.922
Result units: Volume
Specific Surface Area: 0.873 m^2/g
Surface Weighted Mean D[3,2]: 6.876 μm
Vol. Weighted Mean D[4,3]: 19.099 μm

d(0.1): 3.433 μm d(0.5): 12.954 μm d(0.9): 41.303 μm



— SoroP6Prob2 - Average, quinta-feira, 23 de agosto de 2012 10:23:00

Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)
0.020	0.00	0.150	0.00	1.250	0.04	10.000	0.27	70.420	0.00	500.000	0.00
0.025	0.00	0.162	0.00	1.440	0.07	11.462	0.42	81.205	0.01	724.000	0.00
0.030	0.00	0.208	0.00	1.600	0.07	13.100	0.42	104.710	0.01	921.754	0.00
0.035	0.00	0.240	0.00	1.800	0.07	15.136	0.94	130.220	0.01	1064.900	0.00
0.040	0.00	0.270	0.00	2.100	0.07	17.370	0.32	160.000	0.05	1306.470	0.00
0.045	0.00	0.310	0.00	2.400	0.40	19.900	5.38	190.400	0.08	1560.000	0.00
0.050	0.00	0.360	0.00	2.800	1.00	22.900	5.21	241.070	0.00	1845.400	0.00
0.055	0.00	0.417	0.00	3.300	1.19	26.300	4.02	290.000	0.00	2165.500	0.00
0.060	0.00	0.479	0.00	3.900	1.40	30.200	2.20	346.800	0.00	2495.400	0.00
0.065	0.00	0.546	0.10	4.500	2.47	34.670	2.88	410.420	0.00	2850.000	0.00
0.070	0.00	0.619	0.21	5.200	3.11	39.810	2.21	480.200	0.00	3230.000	0.00
0.075	0.00	0.700	0.44	6.000	3.91	45.700	1.80	556.800	0.00	3630.000	0.00
0.080	0.00	0.789	0.87	7.000	4.92	52.400	1.25	640.000	0.00	4050.000	0.00
0.085	0.00	0.886	1.50	8.100	6.23	59.900	1.34	730.000	0.00	4490.000	0.00
0.090	0.00	0.992	2.39	9.300	7.82	68.100	1.14	826.000	0.00	4950.000	0.00
0.095	0.00	1.108	3.56	10.600	9.72	77.000	0.80	928.000	0.00	5430.000	0.00
0.100	0.00	1.234	5.00	12.000	11.90	86.600	0.50	1036.000	0.00	5930.000	0.00

Operator note:



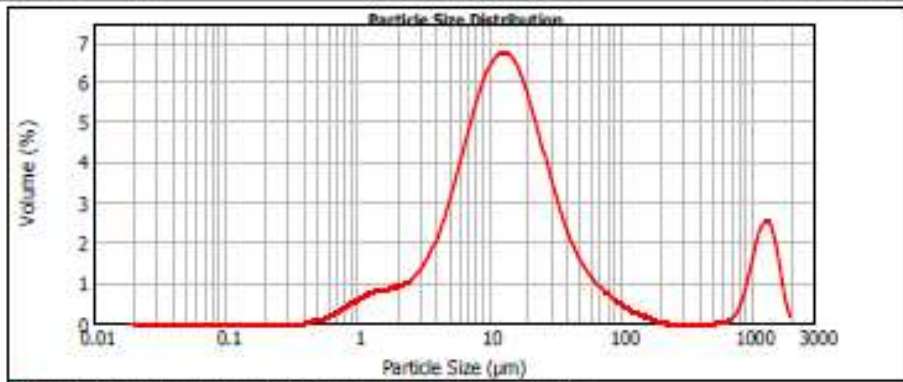
Result Analysis Report

Sample Name: SoroP6Prob3 - Average
Sample Source & type:
Sample bulk lot ref:
SOP Name:
Measured by: Guilherme DTA
Result Source: Averaged
Measured: quinta-feira, 23 de agosto de 2012 10:54:08
Analysed: quinta-feira, 23 de agosto de 2012 10:54:09

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: 5.09 %
Dispersant Name: Ethanol
Dispersant RI: 1.360
Weighted Residual: 0.163 %
Result Emulation: Off

Concentration: 0.0058 %Vol
Span : 7.402
Uniformity: 0.03
Result units: Volume
Specific Surface Area: 0.773 m^2/g
Surface Weighted Mean D[3,2]: 7.765 μm
Vol. Weighted Mean D[4,3]: 132.721 μm

d(0.1): 3.819 μm d(0.5): 13.874 μm d(0.9): 106.514 μm



-SoroP6Prob3 - Average, quinta-feira, 23 de agosto de 2012 10:54:08

Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)
0.020	0.00	0.150	0.00	1.250	0.06	10.000	5.08	70.420	0.59	500.000	0.00
0.025	0.00	0.160	0.00	1.440	0.74	11.400	6.08	81.200	0.40	704.000	0.20
0.026	0.00	0.200	0.00	1.600	0.70	13.000	6.08	104.700	0.24	821.700	0.23
0.030	0.00	0.240	0.00	1.800	0.60	15.000	5.03	120.200	0.20	954.000	1.40
0.036	0.00	0.270	0.00	2.160	0.60	17.200	5.40	130.200	0.20	1096.000	1.40
0.040	0.00	0.270	0.00	2.512	0.60	19.600	5.40	150.400	0.17	1256.000	2.14
0.046	0.00	0.360	0.00	2.880	1.21	22.400	4.94	181.000	0.10	1445.400	2.20
0.050	0.00	0.450	0.00	3.300	1.21	25.300	4.18	200.000	0.00	1656.500	1.80
0.060	0.00	0.450	0.00	3.800	1.51	30.300	3.01	234.800	0.00	1905.400	0.00
0.066	0.00	0.590	0.12	4.300	1.40	34.000	2.07	270.400	0.00	2000.000	0.00
0.070	0.00	0.670	0.22	5.000	2.00	38.000	1.84	310.200	0.00	2107.700	0.00
0.081	0.00	0.720	0.21	5.750	3.00	40.700	1.40	360.000	0.00		
0.100	0.00	0.900	0.40	6.600	4.30	52.400	1.17	410.000	0.00		
0.120	0.00	1.080	0.50	7.500	4.90	60.200	0.94	470.000	0.00		
0.150	0.00	1.350	0.80	8.500	5.40	70.400	0.70	540.000	0.00		

Operator notes:



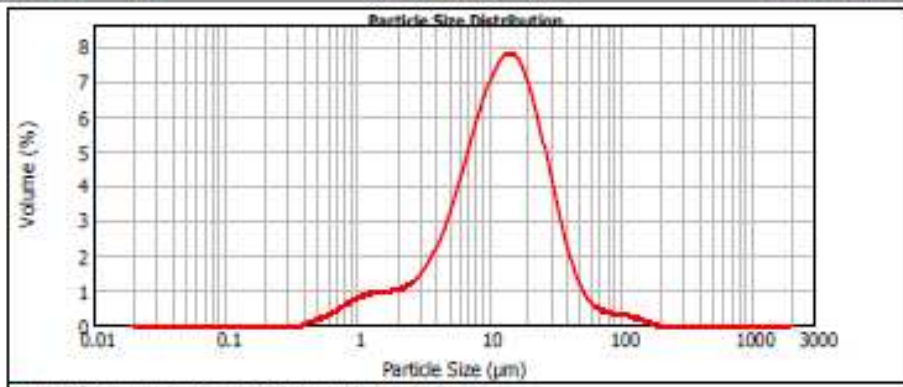
MASTERSIZER 2000

Result Analysis Report

Sample Name: LeitePóProb
SOP Name:
Measured: quinta-feira, 23 de agosto de 2012 10:40:28
Sample Source & type:
Measured by: Guilherma DTA
Analysed: quinta-feira, 23 de agosto de 2012 10:40:29
Sample bulk lot ref:
Result Source: Measurement

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: 6.15 %
Dispersant Name: Ethanol
Dispersant RI: 1.360
Weighted Residual: 0.195 %
Result Emulation: Off
Concentration: 0.0058 %Vol
Span : 2.278
Uniformity: 0.772
Result units: Volume
Specific Surface Area: 0.928 m^2/g
Surface Weighted Mean D[3,2]: 6.482 μm
Vol. Weighted Mean D[4,3]: 16.356 μm

d(0.1): 3.210 μm d(0.5): 12.479 μm d(0.9): 31.643 μm



LeitePóProb, quinta-feira, 23 de agosto de 2012 10:40:28

Size (μm)	Volume (%)	Size (μm)	Volume (%)	Size (μm)	Volume (%)	Size (μm)	Volume (%)	Size (μm)	Volume (%)	Size (μm)	Volume (%)
0.020	0.00	0.150	0.00	1.250	0.02	10.000	0.00	75.430	0.00	500.000	0.00
0.025	0.00	0.160	0.00	1.440	0.02	11.462	0.04	81.209	0.00	724.406	0.00
0.030	0.00	0.200	0.00	1.600	0.02	13.161	0.04	94.713	0.00	821.754	0.00
0.040	0.00	0.260	0.00	1.800	0.04	15.136	0.08	107.226	0.04	954.960	0.00
0.050	0.00	0.320	0.00	2.148	0.02	17.378	0.07	120.286	0.00	1096.476	0.00
0.060	0.00	0.400	0.00	2.512	0.04	19.952	0.07	136.469	0.13	1256.028	0.00
0.080	0.00	0.500	0.00	2.894	1.12	22.908	0.04	155.375	0.02	1445.940	0.00
0.100	0.00	0.630	0.00	3.311	1.34	26.303	0.16	176.600	0.00	1666.507	0.00
0.125	0.00	0.790	0.00	3.771	1.85	29.303	0.22	199.800	0.00	1905.461	0.00
0.160	0.00	1.000	0.00	4.300	2.02	34.074	0.30	225.425	0.00	2099.000	0.00
0.200	0.00	1.260	0.00	5.012	2.07	39.611	0.38	253.226	0.00	2317.750	0.00
0.250	0.00	1.580	0.00	5.754	2.17	45.709	1.05	283.076	0.00		
0.315	0.00	2.000	0.00	6.607	3.00	52.461	1.04	315.889	0.00		
0.398	0.00	2.560	0.00	7.580	4.30	60.290	1.72	351.000	0.00		
0.500	0.00	3.280	0.70	8.710	5.27	69.103	0.44	388.541	0.00		
0.630	0.00	4.180	0.76	10.000	5.80	79.431	0.37	428.957	0.00		

Operator notes:



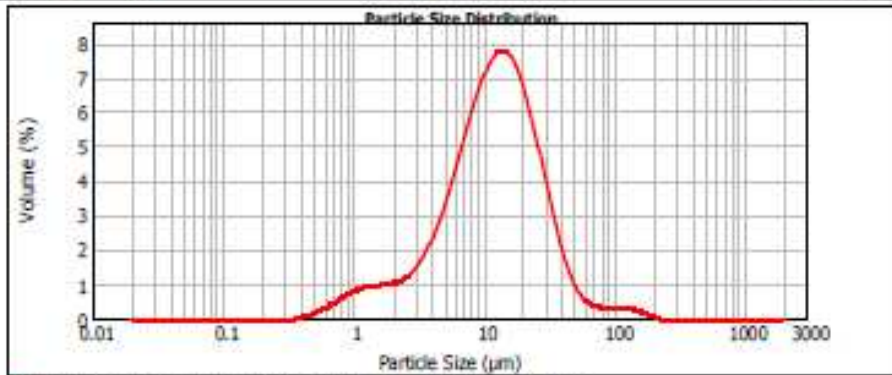
Result Analysis Report

Sample Name: LeiteP0Prob2 - Average
Sample Source & type:
Sample bulk lot ref:
SOP Name:
Measured by: Guilherme DTA
Result Source: Averaged
Measured: quinta-feira, 23 de agosto de 2012 10:44:19
Analysed: quinta-feira, 23 de agosto de 2012 10:44:20

Particle Name: Fraunhofer
Particle Rt: 0.000
Dispersant Name: Ethanol
Accessory Name: Hydro 2000S (A)
Absorption: 0
Dispersant Rt: 1.350
Analysis model: General purpose (spherical)
Size range: 0.020 to 2000.000 μm
Weighted Residual: 0.165 %
Sensitivity: Normal
Obscuration: 8.01 %
Result Emulation: Off

Concentration: 0.0055 %Vol
Specific Surface Area: 0.955 m^2/g
Span : 2.302
Surface Weighted Mean D[3,2]: 6.284 μm
Uniformity: 0.816
Vol. Weighted Mean D[4,3]: 16.352 μm
Result units: Volume

d(0.1): 3.103 μm d(0.5): 12.085 μm d(0.9): 30.918 μm



LeiteP0Prob2 - Average, quinta-feira, 23 de agosto de 2012 10:44:19

Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)
0.020	0.00	0.150	0.00	1.250	0.00	10.000	6.01	75.420	0.00	600.000	0.00
0.025	0.00	0.160	0.00	1.400	0.00	11.400	6.94	81.201	0.00	724.000	0.00
0.030	0.00	0.200	0.00	1.600	0.00	13.100	6.94	104.710	0.00	821.750	0.00
0.035	0.00	0.240	0.00	1.800	0.00	15.100	7.04	130.220	0.00	944.900	0.00
0.040	0.00	0.270	0.00	2.100	0.00	17.310	6.97	158.220	0.07	1064.410	0.00
0.045	0.00	0.310	0.00	2.400	0.00	19.800	6.44	189.480	0.00	1250.000	0.00
0.050	0.00	0.350	0.00	2.600	0.00	22.400	5.77	213.970	0.15	1445.400	0.00
0.055	0.00	0.400	0.00	3.000	0.00	25.300	4.90	250.000	0.00	1659.500	0.00
0.060	0.00	0.450	0.00	3.400	0.00	28.500	3.98	294.800	0.00	1905.400	0.00
0.065	0.00	0.500	0.00	3.800	0.00	32.000	3.04	345.420	0.00	2000.000	0.00
0.070	0.00	0.550	0.00	4.300	0.00	35.800	2.19	402.250	0.00	2107.700	0.00
0.075	0.00	0.600	0.00	4.800	0.00	40.000	1.46	465.000	0.00		
0.080	0.00	0.650	0.00	5.400	0.00	44.600	0.88	534.000	0.00		
0.085	0.00	0.700	0.00	6.000	0.00	49.600	0.47	609.000	0.00		
0.090	0.00	0.750	0.00	6.700	0.00	55.000	0.26	690.000	0.00		
0.095	0.00	0.800	0.00	7.500	0.00	60.800	0.14	777.000	0.00		
0.100	0.00	0.850	0.00	8.400	0.00	67.100	0.08	870.000	0.00		
0.105	0.00	0.900	0.00	9.400	0.00	74.000	0.04	970.000	0.00		
0.110	0.00	0.950	0.00	10.500	0.00	81.500	0.02	1077.000	0.00		
0.115	0.00	1.000	0.00	11.700	0.00	89.700	0.01	1191.000	0.00		
0.120	0.00	1.050	0.00	13.000	0.00	98.600	0.00	1313.000	0.00		

Operator note:

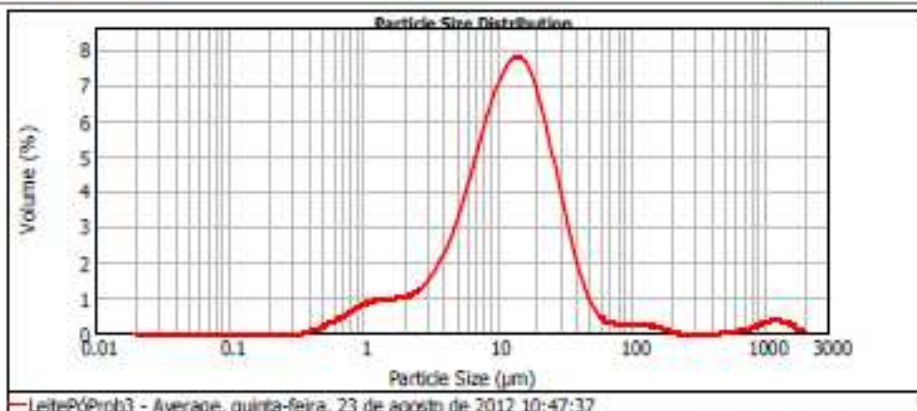


Result Analysis Report

Sample Name: LeiteP6Prob3 - Average
Sample Source & type:
Sample bulk lot ref:
SOP Name:
Measured by: Oulherme DTA
Result Source: Averaged
Measured: quinta-feira, 23 de agosto de 2012 10:47:37
Analysed: quinta-feira, 23 de agosto de 2012 10:47:39

Particle Name: Fraunhofer
Particle RI: 0.000
Dispersant Name: Ethanol
Accessory Name: Hydro 2000S (A)
Absorption: 0
Dispersant RI: 1.360
Analysis model: General purpose (spherical)
Size range: 0.020 to 2000.000 μm
Weighted Residual: 0.144 %
Sensitivity: Normal
Obscuration: 8.79 %
Result Emulation: Off
Concentration: 0.0083 %Vol
Span : 2.342
Uniformity: 2.33
Result units: Volume
Specific Surface Area: 0.945 m^2/g
Surface Weighted Mean D[3,2]: 6.351 μm
Vol. Weighted Mean D[4,3]: 35.513 μm

d(0.1): 3.125 μm **d(0.5):** 12.385 μm **d(0.9):** 32.128 μm



Size (μm)	Volume (%)	Size (μm)	Volume (%)	Size (μm)	Volume (%)	Size (μm)	Volume (%)	Size (μm)	Volume (%)	Size (μm)	Volume (%)
0.000	0.00	0.150	0.00	1.250	0.00	10.000	0.00	75.400	0.00	500.000	0.00
0.005	0.00	0.160	0.00	1.400	0.00	11.400	0.00	81.200	0.00	550.000	0.00
0.010	0.00	0.170	0.00	1.550	0.00	12.900	0.00	92.000	0.00	600.000	0.00
0.015	0.00	0.180	0.00	1.700	0.00	14.400	0.00	103.000	0.00	650.000	0.00
0.020	0.00	0.190	0.00	1.850	0.00	15.900	0.00	114.000	0.00	700.000	0.00
0.025	0.00	0.200	0.00	2.000	0.00	17.400	0.00	125.000	0.00	750.000	0.00
0.030	0.00	0.210	0.00	2.150	0.00	18.900	0.00	136.000	0.00	800.000	0.00
0.035	0.00	0.220	0.00	2.300	0.00	20.400	0.00	147.000	0.00	850.000	0.00
0.040	0.00	0.230	0.00	2.450	0.00	21.900	0.00	158.000	0.00	900.000	0.00
0.045	0.00	0.240	0.00	2.600	0.00	23.400	0.00	169.000	0.00	950.000	0.00
0.050	0.00	0.250	0.00	2.750	0.00	24.900	0.00	180.000	0.00	1000.000	0.00
0.055	0.00	0.260	0.00	2.900	0.00	26.400	0.00	191.000	0.00		
0.060	0.00	0.270	0.00	3.050	0.00	27.900	0.00	202.000	0.00		
0.065	0.00	0.280	0.00	3.200	0.00	29.400	0.00	213.000	0.00		
0.070	0.00	0.290	0.00	3.350	0.00	30.900	0.00	224.000	0.00		
0.075	0.00	0.300	0.00	3.500	0.00	32.400	0.00	235.000	0.00		
0.080	0.00	0.310	0.00	3.650	0.00	33.900	0.00	246.000	0.00		
0.085	0.00	0.320	0.00	3.800	0.00	35.400	0.00	257.000	0.00		
0.090	0.00	0.330	0.00	3.950	0.00	36.900	0.00	268.000	0.00		
0.095	0.00	0.340	0.00	4.100	0.00	38.400	0.00	279.000	0.00		
0.100	0.00	0.350	0.00	4.250	0.00	39.900	0.00	290.000	0.00		
0.105	0.00	0.360	0.00	4.400	0.00	41.400	0.00	301.000	0.00		
0.110	0.00	0.370	0.00	4.550	0.00	42.900	0.00	312.000	0.00		
0.115	0.00	0.380	0.00	4.700	0.00	44.400	0.00	323.000	0.00		
0.120	0.00	0.390	0.00	4.850	0.00	45.900	0.00	334.000	0.00		
0.125	0.00	0.400	0.00	5.000	0.00	47.400	0.00	345.000	0.00		
0.130	0.00	0.410	0.00	5.150	0.00	48.900	0.00	356.000	0.00		
0.135	0.00	0.420	0.00	5.300	0.00	50.400	0.00	367.000	0.00		
0.140	0.00	0.430	0.00	5.450	0.00	51.900	0.00	378.000	0.00		
0.145	0.00	0.440	0.00	5.600	0.00	53.400	0.00	389.000	0.00		
0.150	0.00	0.450	0.00	5.750	0.00	54.900	0.00	400.000	0.00		

Operator notes: