



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ANA CLARA GONÇALVES DELLA TORRE

**Microencapsulação de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* utilizando gordura do leite modificada como estratégia para minimizar a pós-acidificação em iogurte**

**Microencapsulation of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* using modified milk fat as a strategy to minimize post-acidification in yogurt**

CAMPINAS

2023

**ANA CLARA GONÇALVES DELLA TORRE**

**Microencapsulação de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* utilizando gordura do leite modificada como estratégia para minimizar a pós-acidificação em iogurte**

**Microencapsulation of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* using modified milk fat as a strategy to minimize post-acidification in yogurt**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Tecnologia de alimentos

Dissertation presented to the Faculty of Food Engineering of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Food Technology

**Orientadora:** Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELA ALUNA ANA CLARA  
DELLA TORRE E ORIENTADA PELA  
PROFA. DRA. MIRNA LÚCIA GIGANTE

**CAMPINAS**

**2023**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

D38m Della Torre, Ana Clara Gonçalves, 1995-  
Microencapsulação de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* utilizando gordura do leite modificada como estratégia para minimizar a pós-acidificação no iogurte / Ana Clara Gonçalves Della Torre. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

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

1. Bactérias produtoras de ácido láctico. 2. *Spray chilling*. 3. Leite fermentado. 4. *Shelf life*. I. Gigante, Mima Lúcia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações Complementares

**Título em outro idioma:** Microencapsulation of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* using modified milk fat as a strategy to minimize post-acidification in yogurt

**Palavras-chave em inglês:**

Lactic acid bacteria

*Spray chilling*

Fermented Milk

*Shelf life*

**Área de concentração:** Tecnologia de Alimentos

**Titulação:** Mestra em Tecnologia de Alimentos

**Banca examinadora:**

Mima Lúcia Gigante [Orientador]

Aline de Souza Lopes

Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá

**Data de defesa:** 05-12-2022

**Programa de Pós-Graduação:** Tecnologia de Alimentos

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-0215-8819>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7265302331212481>

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

**Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante**

Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP

**Dra. Aline de Souza Lopes**

Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP

**Dra. Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá**

Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL

A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertações/Teses e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação

*Aos meus pais, Elza e Celso, que me tornaram quem eu sou e sempre me colocaram em suas orações, concedendo a motivação e a proteção de que*

*precisei*

*Ao meu marido, Alex, pelo apoio e paciência incondicionais durante este*

*processo. Dedico!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por ter me concedido a proteção, a saúde e a coragem necessárias nesta conquista. Obrigada por ser tão abençoada!

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Mirna Lúcia Gigante pela oportunidade em realizar o mestrado sob sua orientação e por ter feito parte do meu crescimento pessoal e profissional neste processo.

À Dra. Mayara de Souza Queirós, por compartilhar sempre seus conhecimentos e experiências com toda atenção e carinho.

À Bete e Aline, técnicas de laboratório, pela grande ajuda na execução das análises e pela companhia nos dias solitários de laboratório durante a pandemia. À Leila por ter disponibilizado seu tempo me auxiliando com as vidrarias durante horas e horas nos dias de processamento.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Paula Badan Ribeiro e toda a equipe do laboratório de óleos e gorduras pela disponibilidade e atendimento sempre que necessário

Agradeço ao meu grupo de pesquisa que tanto me ensinou e fizeram parte do desenvolvimento deste projeto. Obrigada por toda ajuda, mesmo que a distância nos anos de pandemia. Obrigada pela paciência em ensinar através de extensas trocas de mensagens, longos áudios e chamadas de vídeo.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, que me fortaleceram mais do que imaginam: Kívea, Débora, Luís, Aninha e Joyce, vocês possuem um lugar muito especial na minha trajetória e coração!

As minhas irmãs que torceram por esta vitória. Em especial a minha irmã e amiga Maria Raquel, muito obrigada pela ajuda emocional neste processo.

Aos meus pais, que me incumbiram na fé e tanto trabalharam para que eu recebesse a educação que me trouxeram até aqui.

Ao meu marido Alex, em que palavras não são o suficiente para expressar minha eterna gratidão a você, que nunca hesitou nem por um segundo em me apoiar em todos os aspectos necessários neste processo.

Aos membros da banca examinadora, agradeço a disponibilidade da leitura da dissertação.

À Unicamp, agradeço a estrutura para a realização deste trabalho e a oportunidade de conhecer e trabalhar com grandes profissionais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado (Processo 133455/2019-0).

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

## RESUMO

O iogurte é o leite fermentado de maior consumo mundial, porém, seu prazo de validade ainda é relativamente pequeno, cerca de 30 dias, uma vez que mesmo sob refrigeração a atividade metabólica do *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* persiste, resultando na pós-acidificação do produto e na redução da viabilidade das bactérias ácidos lácticas. Estratégias que reduzam a atividade metabólica dos microrganismos visando aumentar a vida de prateleira do produto são de interesse da indústria e dos consumidores. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do tratamento térmico e da posterior reintegração de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* livres e microencapsulados em gordura anidra do leite modificada como estratégia para aumentar a vida de prateleira do iogurte tradicional batido mantido sob refrigeração ( $4 \pm 1^\circ \text{C}$ ). Para tanto, iogurte firme produzido pelo método tradicional foi batido e dividido em duas porções. Uma delas foi armazenada a  $4^\circ\text{C}$  (iogurte tradicional) e a outra foi submetida ao tratamento térmico ( $82^\circ\text{C}/2\text{min.}$ ) e subdividida, sendo uma delas adicionada de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* livres, na forma de *pellet* concentrado (iogurte tratado termicamente adicionado de microrganismos livres), e a outra dos microrganismos encapsulados pela técnica de *spray chilling*, usando gordura anidra do modificada como material de parede (iogurte tratado termicamente adicionado microrganismos encapsulados). O delineamento experimental utilizado foi um esquema fatorial  $3 \times 10$ , em blocos completamente casualizados com três repetições. As micropartículas foram avaliadas quanto ao tamanho, microestrutura, perfil de fusão e viabilidade dos microrganismos. Durante a fermentação, amostras foram retiradas em intervalos de 30 minutos para acompanhamento do pH e da acidez titulável. O tempo de fermentação foi considerado o necessário para que o pH atingisse  $4,9 \pm 0,05$ . Após estabilização, os iogurtes foram avaliados quanto à composição físico-química e contagem total de bactérias ácido lácticas. Após 0, 10, 20, 40, 50, 60, 70 80 e 90 dias de armazenamento refrigerado os iogurtes foram avaliados quanto à acidez (% de ácido láctico), pH e contagem total de bactérias ácido lácticas. As micropartículas, esféricas, lisas e heterogêneas, apresentaram diâmetro médio de  $173\mu\text{m}$ , comportamento térmicos de fusão típico da gordura anidra do modificada e contagem e média de bactérias lácticas totais de  $10,81 \log \text{UFC/g}$ . O tempo médio de fermentação necessário para que o pH atingisse  $4,9 \pm 0,05$  foi de  $170 \pm 17 \text{ min}$ , ou 2,8 horas, o que é compatível com o tempo de fermentação do leite obtidos por culturas lácticas ativas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus*

*delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. O tratamento térmico utilizado (82°C/2 min.) foi capaz de reduzir em média 6,12 ciclos logarítmicos da concentração inicial das bactérias ácido lácticas. Os iogurtes não apresentaram diferenças significativas em relação ao pH e os teores de sólidos totais, proteínas, cinzas e lactose. Entretanto, diferiram significativamente em relação aos teores de gordura e % de ácido láctico. Todos os iogurtes apresentam contagem de bactérias lácticas totais acima do limite estabelecido pela legislação ( $10^7$  UFC/g), sendo que o iogurte tradicional apresentou contagem significativamente maior ( $1,14 \times 10^{10}$  UFC/g) do que o iogurte tratado termicamente adicionado de microrganismos livres ( $5,93 \times 10^8$  UFC/g) ou de microrganismos encapsulados ( $7,07 \times 10^8$  UFC/g), os quais não diferiram entre si. Independente dos tratamentos, durante o armazenamento refrigerado observou-se o aumento da acidez e a redução do pH. No entanto, a pós-acidificação dos iogurtes, foi afetada pela interação entre os fatores tratamento e tempo de armazenamento. Enquanto o iogurte tradicional atingiu 1,5% de ácido láctico, que é o valor máximo permitido pela legislação, após 45 dias de armazenamento refrigerado, e 1,70 % de ácido láctico após 50 dias de armazenamento, os iogurtes tratados termicamente, adicionados de microrganismo livres ou encapsulados, mantiveram a acidez abaixo do limite estabelecido pela legislação durante os 90 dias de armazenamento. Os produtos não apresentaram diferença significativa de pH e acidez, que foi de 4,28 e 0,98 % de ácido láctico para o iogurte adicionado de microrganismos livres e 4,35 e 0,94 % de ácido láctico para os adicionados de microrganismos encapsulados. Independente da forma de adição dos microrganismos, os iogurtes tratados termicamente mantiveram altas contagens de bactérias lácticas durante 90 dias de armazenamento refrigerado, enquanto o iogurte tradicional apresentou queda constante na viabilidade de bactérias lácticas, a qual foi acentuada e abrupta após 60 dias de armazenamento. Após 70 dias de armazenamento o iogurte tradicional apresentou contagens de 6,87 log UFC/g do produto, ou seja, fora do padrão estabelecido pela legislação ( $\geq 10^7$  UFC/g de produto), enquanto os iogurtes tratados termicamente, mesmo após 90 dias de armazenamento refrigerado apresentaram contagens de 8,86 e 8,85 logs UFC/g quando os microrganismos foram adicionados na forma livre ou encapsulada, respectivamente. Em resumo, conclui-se que o tratamento térmico do iogurte seguido da adição de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, livres ou encapsulados, pode aumentar a vida de prateleira de iogurte (> 90 dias) quando comparado ao iogurte tradicional, o qual teve sua vida de prateleira limitada a 50 dias por alcançar acidez maior que 1,5% de ácido láctico.

**Palavras-chave:** Bactérias ácido lácticas; Gordura anidra do leite totalmente hidrogenada; *Spray chilling*; Leite fermentado; *Shelf life*

## ABSTRACT

Yogurt is the fermented milk most consumed in the world, however, its shelf life is still relatively short, about 30 days, because even under refrigeration the metabolic activity of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* persist, resulting in a post-acidification of the product and reduced viability of lactic acid bacteria. Strategies to reduce the metabolic activity of microorganisms to increase the shelf life of the yogurt are of interest to the industry and consumers. In this context, the objective of this work was to evaluate the effect of heat treatment and subsequent reintegration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* free and microencapsulated in modified anhydrous milk fat as a strategy to increase the shelf life of traditional stirred yogurt kept under refrigeration ( $4 \pm 1^\circ \text{C}$ ). For this, the set yogurt produced by the traditional method was stirred and divided in two portions. One of them was stored at  $4^\circ\text{C}$  (traditional yogurt) and the other was subjected to heat treatment ( $82^\circ\text{C}/2\text{min.}$ ) and subdivided in another two portions. One of them was added with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, in the form of a concentrated pellet (heat treated yogurt added free microorganisms), and the other was added of microorganisms encapsulated by the spray chilling technique, using modified anhydrous fat as wall material (heat treated yogurt added encapsulated microorganisms). The experimental design used was a  $3 \times 10$  factorial scheme, in completely randomized blocks with three repetitions. The microparticles were evaluated in relation of size, microstructure, melting profile and microorganism viability. During fermentation, samples were analyzed every 30 minutes to monitor pH and titratable acidity. The fermentation time was considered as necessary for the pH to reach  $4.9 \pm 0.05$ . After stabilization, the yogurts were evaluated for physicochemical composition and total count of lactic acid bacteria. After 0, 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80 and 90 days of refrigerated storage, the yogurts were evaluated for acidity (% lactic acid), pH and total count of lactic acid bacteria. The spherical, smooth and heterogeneous microparticles had an average diameter of  $173\mu\text{m}$ , thermal melting behavior typical of modified anhydrous fat and total lactic acid bacteria count of  $10.81 \log \text{CFU/g}$ . The average fermentation time required for the pH to reach  $4.9 \pm 0.05$  was  $170 \pm 17 \text{ min}$ , or 2.8 hours, which is compatible with the fermentation time of milk obtained by active lactic cultures of *Streptococcus*

*thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. The heat treatment used (82°C/2 min.) was able to reduce an average of 6.12 log cycles from the initial concentration of lactic acid bacteria. Yogurts did not show significant differences into pH and contents of total solids, proteins, ash and lactose. However, they differed significantly in relation to fat contents and % lactic acid. All yoghurt has a total lactic bacteria count above the limit established by law ( $10^7$  CFU/g), with the traditional yoghurt having a significantly higher count ( $1.14 \times 10^{10}$  CFU/g) than the heat treated yogurt added free microorganisms ( $5.93 \times 10^8$  CFU/g) or added of encapsulated microorganisms ( $7.07 \times 10^8$  CFU/g), which did not differ from each other. Regardless of the treatments, during cold storage, an increase in acidity and a reduction in pH were observed. However, the post-acidification of yogurts was affected by the interaction between the treatment and storage time factors. While traditional yogurt reached 1.5% lactic acid, which is the maximum value allowed by legislation, after 45 days of cold storage, and 1.70% lactic acid after 50 days of storage, heat-treated yogurts, added with free or encapsulated microorganisms, kept the acidity below the limit established by legislation during the 90 days of storage. The products showed no significant difference in pH and acidity, which was 4.28 and 0.98% lactic acid for yogurt added with free microorganisms and 4.35 and 0.94% lactic acid for those added with encapsulated microorganisms. Regardless of the way in which the microorganisms were added, the heat-treated yogurts maintained high counts of lactic acid bacteria during 90 days of refrigerated storage, while the traditional yogurt showed a constant drop in the viability of lactic acid bacteria, which was accentuated and abrupt after 60 days of storage. After 70 days of storage, traditional yogurt showed counts of 6.87 log CFU/g of product, that is, outside the standard established by legislation ( $\geq 10^7$  CFU/g of product), while heat-treated yogurts, even after 90 days of refrigerated storage showed counts of 8.86 and 8.85 logs CFU/g when the microorganisms were added in the free or encapsulated form, respectively. In summary, it is concluded that the heat treatment of yogurt followed by the addition of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, free or encapsulated, can increase the shelf life of yogurt (> 90 days) when compared to traditional yogurt, which had its shelf life limited to 50 days because it reached acidity greater than 1.5% lactic acid.

**Keywords:** Lactic acid bacteria; Fully hydrogenated anhydrous milk fat; Spray chilling; Fermented milk; Shelf life

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Crescimento de cocos e bastonetes em iogurte fermentado a 45 °C em leite. A porcentagem de inóculo é igual a 2,5. N = contagem em ml <sup>-1</sup> . Fonte: Adaptado de Walstra; Wouters & Geurts (2006).....	24
<b>Figura 2:</b> Esquema geral de desenvolvimento do trabalho. ST = Sólidos totais. GALM = Gordura anidra do leite modificada. ....	36
<b>Figura 3:</b> Fluxograma de produção das micropartículas.....	38
<b>Figura 4:</b> Aspecto visual das micropartículas lipídicas sólidas contendo <i>Lactobacillus bulgaricus</i> e <i>Streptococcus thermophilus</i> obtidas por spray chilling. ....	44
<b>Figura 5:</b> Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das micropartículas lipídicas produzidas com gordura anidra do leite modificada (GALM) contendo <i>Lactobacillus bulgaricus</i> e <i>Streptococcus thermophilus</i> estabilizadas a 5 °C por 24 horas, com aumento de 200; 400 e 1000x nas três repetições de processo. ....	46
<b>Figura 6:</b> Diâmetro médio e distribuição de tamanho das micropartículas lipídicas estabilizadas a 5°C/24h. ....	46
<b>Figura 7:</b> Termogramas das micropartículas lipídicas contendo <i>Lactobacillus bulgaricus</i> e <i>Streptococcus thermophilus</i> estabilizadas a 5 °C por 24 horas para os três processos. ....	47
<b>Figura 8:</b> Comportamento do pH durante a fermentação dos iogurtes. ....	49
<b>Figura 9:</b> Comportamento da acidez durante a fermentação dos iogurtes. ....	49
<b>Figura 10:</b> Aspecto visual dos iogurtes no tempo 0 de armazenamento.....	50
<b>Figura 11:</b> Efeito da interação entre os tratamentos e do tempo de armazenamento sobre a acidez (a) e o pH (b) dos iogurtes durante armazenamento a 4°C (n=3). Iogurte Tradicional, iogurte tratado termicamente adicionado de microrganismos livres e iogurte tratado termicamente adicionado de microrganismos encapsulados.....	57
<b>Figura 12:</b> Viabilidade das bactérias ácido lácticas totais durante a estocagem a 4°C. Iogurte Tradicional, iogurte tratado termicamente adicionado de microrganismos livres e iogurte tratado termicamente adicionado de microrganismos encapsulados.....	59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros de fusão das micropartículas lipídicas contendo <i>Lactobacillus bulgaricus</i> e <i>Streptococcus thermophilus</i> estabilizadas a 5 °C por 24 horas nas três repetições de processos. ....	48
<b>Tabela 2.</b> Comportamento de fermentação do leite para obtenção dos iogurtes tradicionais base. ....	48
<b>Tabela 3.</b> Efeito das etapas do processamento dos iogurtes sobre a viabilidade das bactérias ácido-láticas totais. ....	51
<b>Tabela 4.</b> Composição físico-química, contagem microbiológica, desvio padrão e valor de p dos iogurtes tradicional e adicionado de microrganismos livres ou encapsulado utilizando GALM como material de parede (n = 3). ....	52
<b>Tabela 5.</b> Efeito dos tratamentos, do tempo de armazenamento e da interação desses fatores sobre pH e acidez dos iogurtes (ANOVA) (n = 3). ....	55
<b>Tabela 6.</b> Valores pH, acidez ( $\pm$ desvio padrão) do iogurte tradicional e dos iogurtes tratado termicamente adicionado de microrganismos livres ou encapsulados durante 90 dias de armazenamento a 4°C (n=3). ....	56
<b>Tabela 7.</b> Viabilidade das bactérias ácido láticas totais dos iogurtes durante armazenamento a 4°C. (n=3). ....	58

## SUMÁRIO

<b>1.0.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2.0.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	18
<b>2.1.</b>	<b>Leites Fermentados e iogurte</b>	18
<b>2.1.1</b>	<b>Processo de fabricação do iogurte</b>	19
<b>2.2.</b>	<b>Iogurte tratado termicamente</b>	26
<b>2.3.</b>	<b>Adição de estabilizantes em iogurtes e seus derivados</b>	28
<b>2.4.</b>	<b>Vida de prateleira do iogurte</b>	29
<b>2.5.</b>	<b>Microencapsulação de bactérias ácido lácticas</b>	33
<b>3.0.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	36
<b>3.1.</b>	<b>Esquema geral do trabalho</b>	36
<b>3.2.</b>	<b>Ativação dos microrganismos, preparo da cultura láctica e da suspensão de microrganismos</b>	37
<b>3.3.</b>	<b>Caracterização das matérias primas</b>	37
<b>3.4.</b>	<b>Fabricação das micropartículas</b>	37
<b>3.5.</b>	<b>Caracterização das micropartículas</b>	39
<b>3.5.1.</b>	<b>Morfologia</b>	39
<b>3.5.2.</b>	<b>Tamanho das micropartículas</b>	39
<b>3.5.3.</b>	<b>Comportamento térmico de fusão</b>	39
<b>3.5.4.</b>	<b>Contagem de bactérias ácido lácticas totais</b>	40
<b>3.6.</b>	<b>Fabricação do iogurte firme, iogurte batido tradicional, iogurte batido tratado termicamente e adicionado de microrganismos livres ou encapsulado</b>	40
<b>3.7.</b>	<b>Caracterização físico-química das matérias primas, ingredientes e dos iogurtes</b>	41
<b>3.8.</b>	<b>Delineamento experimental e análise dos resultados</b>	42
<b>4.0.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	43
<b>4.1.</b>	<b>Produção e caracterização das micropartículas</b>	43

4.2.	Produção do iogurte batido tradicional base .....	48
4.3.	Produção e caracterização dos iogurtes tratados termicamente adicionado de <i>Streptococcus thermophilus</i> e <i>Lactobacillus bulgaricus</i> livres e encapsulados utilizando GALM como material de parede .....	50
4.4.	Efeito dos tratamentos e do tempo de armazenamento refrigerado sobre pH, acidez e viabilidade das bactérias ácido láticas dos iogurtes.....	54
5.0.	CONCLUSÃO .....	63
6.0.	REFERÊNCIAS .....	64

## 1.0. INTRODUÇÃO

A fermentação é um dos métodos mais antigos de preservação do leite e diferente dos outros métodos de conservação, que consistem na inativação de microrganismos, baseia-se no desenvolvimento controlado de microrganismos, o que resulta em uma gama variada de produtos, sendo que cerca de 400 nomes genéricos são aplicados aos leites fermentados em todo o mundo (FOX et al., 2015). O iogurte, principal representante dos leites fermentados, é o produto originário da fermentação do leite por *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (referido no texto como *Lactobacillus bulgaricus*, respectivamente) e, por definição, estes microrganismos devem estar viáveis e abundantes no produto final e durante todo seu prazo de validade, em concentração mínima de  $10^7$  UFC/g (BRASIL, 2007).

O processo de fabricação do iogurte inclui, em linhas gerais, a padronização do leite, a inoculação da cultura láctica, seguida da incubação da mistura à temperatura controlada (42-45°C) para que ocorra o desenvolvimento da acidez, que promove a desestabilização e a precipitação da caseína, transformando a mistura líquida em um gel fino e firme. Embora o ácido láctico seja o principal produto, outros compostos que caracterizam o sabor do iogurte, tais como acetaldeído e diacetil são também produzidos durante o processo fermentativo. Após a coagulação do leite, o gel resultante é resfriado ( $\cong 5^\circ\text{C}$ ) para reduzir a atividade metabólica da cultura láctica e mantido sob refrigeração durante a vida de prateleira do iogurte, que é de aproximadamente 28 dias dependendo das condições higiênico sanitárias da matéria prima, ingredientes, bem como de equipamentos e embalagens (TAMIME et al., 2006). Além de manter a alta concentração de células viáveis durante toda sua vida útil, o iogurte deve ter acidez entre 0,6 e 1,5 g de ácido láctico/100g de produto (BRASIL, 2007).

O uso de cultura láctica ativa e equilibrada, necessário para o desenvolvimento da acidez durante a fabricação do iogurte, se torna o principal problema durante o armazenamento refrigerado do produto. A manutenção do metabolismo do *Streptococcus thermophilus* e do *Lactobacillus bulgaricus*, mesmo que lento sob refrigeração, resulta na pós-acidificação do iogurte que limita sua vida de prateleira por ultrapassar o limite de acidez definido pela legislação e/ou inativar os microrganismos que devem permanecer viáveis e em alta concentração ( $10^7$  UFC/g) durante toda a vida de prateleira do produto. O desenvolvimento da acidez durante o armazenamento refrigerado pode levar à rejeição do produto por parte do consumidor, não só por causa do sabor excessivamente ácido,

como também porque o aumento da acidez leva à desestabilização do gel, o que afeta a viscosidade do produto e pode resultar na separação do soro ou sinérese.

Considerando-se que a vida útil do iogurte é limitada pela pós-acidificação, quer seja pelo não atendimento ao padrão de acidez e contagem de células viáveis estabelecido na legislação, quer seja pela rejeição do consumidor pelos aspectos sensoriais, estratégias que venham a limitar a pós-acidificação do produto são desejáveis e de interesse tanto da indústria como dos consumidores. No entanto, os recursos tecnológicos que garantam simultaneamente a viabilidade dos microrganismos e o seu desenvolvimento controlado em um meio rico de nutrientes como o iogurte são limitados. A principal estratégia utilizada para aumentar a vida de prateleira do iogurte tem sido a seleção de linhagens de microrganismos com moderada produção de ácido láctico (CHANDAN et al., 2013). Tamime et al. (2006) sugerem o tratamento térmico do iogurte após a fermentação para prolongar sua vida útil, o que é uma possibilidade. Entretanto, após a destruição dos microrganismos o produto não pode mais ser designado como iogurte e estes alimentos passam a ser nomeados como bebidas de iogurte ou bebidas fermentadas.

Outra estratégia tecnológica utilizada para proteger microrganismos do meio adverso dos alimentos, mantendo sua viabilidade e evitando que os componentes dos alimentos sejam modificados indesejavelmente pelas ações destes microrganismos é a microencapsulação. A proteção conferida aos microrganismos pelo material de parede é capaz de minimizar ou impossibilitar suas interações com os constituintes do alimento, o que não seria possível se os mesmos estivessem em sua forma livre no produto (BROWNLIE, 2007). Adicionalmente, a microencapsulação pode proteger o microrganismo durante sua passagem pelo trato gastrointestinal e essa estratégia tem sido estudada para a proteção de microrganismos probióticos (BOTH et al., 2018; GANI et al., 2018; GONZÁLEZ-FERRERO et al. 2018; SAMEDI & CHARLES, 2019).

Embora diferentes métodos de encapsulação sejam aplicáveis para a proteção de microrganismos, o método de *spray chilling* tem se destacado por utilizar baixas temperaturas e por ser uma técnica simples que dispensa o uso de solventes. Trata-se de uma técnica de atomização de um material lipídico fundido como agente encapsulante em uma câmara refrigerada, que resultará na formação de partículas sólidas (PELISSARI, 2014). Materiais de parede comumente usados são gordura vegetal (BAMPI et al., 2016; SILVA et al., 2018), manteiga de cacau (PEDROSO et al., 2013), óleo de palma totalmente hidrogenado (ARSLAN-TONTUL & ERBAS, 2017).

Partindo do princípio que o principal problema no prazo de validade do iogurte é a pós-acidificação originária das bactérias ácido lácticas viáveis que se encontram livre no produto e a baixa sobrevivência dessas mesmas bactérias durante o armazenamento, a hipótese para este trabalho foi que a inativação do *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* por tratamento térmico no iogurte, seguido da reintrodução desses microrganismos microencapsulados ao iogurte tratado termicamente, pode viabilizar o aumento da vida de prateleira do produto mantido sob refrigeração. Supostamente, protegidos pelo material de parede, os microrganismos podem se manter viáveis na concentração desejável ( $10^7$  UFC/g do produto), mas teriam sua atividade metabólica inibida pela encapsulação, minimizando assim os efeitos da pós-acidificação a aumentando a vida de prateleira do iogurte. O diferencial desse trabalho está na escolha do material de parede utilizado para encapsulação da cultura mista *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, que foi a gordura do leite modificada patenteada pelo nosso grupo de pesquisa (QUEIRÓS et al., 2019). A gordura natural do leite, possui ponto de fusão de aproximadamente 36°C, ou seja, não apresenta a estabilidade térmica necessária para ser utilizada como agente encapsulante. No entanto, a gordura do leite modificada demonstrou potencial para a obtenção de micropartículas estáveis, com capacidade para serem armazenadas à diferentes temperaturas por 90 dias (QUEIRÓS et al., 2020), assim como demonstrou efetividade como matriz encapsulante de *Lactobacillus acidophilus* LA3, onde foi capaz de manter alta viabilidade desta bactéria por 60 dias de armazenamento nas temperaturas -18, 5 e 25 °C (DE PAIVA et al., 2022).

Neste contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do tratamento térmico e da posterior reintegração de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* livres e microencapsulados em gordura do leite modificada sobre a vida de prateleira de iogurte batido mantido sob refrigeração.

## 2.0. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Leites Fermentados e iogurte

Historicamente, o processo de fermentação do leite permitiu o consumo de seus constituintes por um período significativamente maior que o possível para o próprio leite. A conversão de leite em leites fermentados resultou na geração de produtos com uma consistência viscosa distinta, textura lisa e sabor inconfundível. Além disso, a fermentação proporcionou um alimento mais seguro, benefícios a saúde e inovação ao consumidor (CHANDAN et al., 2013).

A fermentação é um dos métodos de preservação do leite mais antigos, sendo as primeiras evidências desta prática relatadas há mais de 10.000 anos no Oriente Médio. O leite é um habitat natural de várias bactérias ácido-láticas, que causam sua acidificação espontânea. O processo fermentativo é resultante do desenvolvimento de bactérias ácido-láticas, as quais metabolizam a lactose em ácido lático que reduz o pH do leite até o ponto isoelétrico das caseínas que precipitam formando um gel firme e fino. O iogurte é o mais conhecido dos leites fermentados e é consumido mundialmente. O sabor, o aroma e consistência do iogurte variam entre os países, desde um líquido altamente viscoso até um produto mais macio, semelhante a um gel. (FOX et al., 2015).

O iogurte é definido como o produto obtido pela diminuição do pH do leite através da fermentação láctica por cultivos simbióticos de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, aos quais se podem adicionar, de forma complementar, outras bactérias lácticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final (CHANDAN et al., 2013; BRASIL, 2007). Os microrganismos específicos da fabricação do iogurte devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final e durante seu prazo de validade. A contagem mínima das bactérias lácticas totais no iogurte deve ser de  $10^7$  UFC/g durante toda sua vida de prateleira e o produto deve apresentar acidez entre 0,6 e 1,5 g de ácido lático/100 g do produto (BRASIL, 2007). De acordo com seu método de produção e estrutura física do coágulo, iogurtes podem ser classificados como firme ou batido. O iogurte líquido é considerado um tipo de iogurte batido de mais baixa viscosidade. Na fabricação do iogurte firme (*set yogurt*) a fermentação ocorre na própria embalagem, sendo que o produto não é submetido à homogeneização, resultando em um produto com consistência de gel. Para a fabricação do iogurte batido (*stirred yogurt*), o leite é fermentado em incubadoras, sofrendo posteriormente ação mecânica que promove uma parcial quebra do

coágulo, podendo ou não ser adicionado de outros ingredientes. O iogurte líquido, após a fermentação, é submetido à agitação mecânica mais intensa, que resulta em total quebra do gel, caracterizando o produto como um líquido viscoso. O processo de fabricação de iogurte pode ser resumido pelas etapas de preparo da mistura, que incluem pré-tratamentos e padronização do leite, homogeneização e tratamento térmico, seguido da fermentação propriamente dita, e posterior resfriamento. O gel assim obtido pode então ser batido ou não, adicionado ou não de outros ingredientes, envasado e armazenamento sob refrigeração (TAMIME & ROBINSON, 1999). O iogurte também pode ser classificado de acordo com o conteúdo de matéria gorda. Se a matéria gorda for no mínimo de 6,0 g/100 g são denominados com creme. Os integrais são aqueles cujo conteúdo de matéria gorda esteja entre 3,0 e 5,9g/100g de produto. Os parcialmente desnatados são aqueles que possuem um conteúdo de matéria-gorda entre 0,6 e 2,9 g/100 g e finalmente, os desnatados têm no máximo 0,5 g/100 de matéria-gorda (BRASIL, 2007).

### **2.1.1 Processo de fabricação do iogurte**

Para fabricação do iogurte, inicialmente, o leite é padronizado em relação aos teores de gordura e/ou sólidos totais, os quais estão intimamente ligados à consistência do iogurte: quanto maior o teor de sólidos, mais firme e consistente será o iogurte. O teor de sólidos não gordurosos ideal para a fabricação do iogurte varia de 8,2-8,6 g em 100 g de leite, enquanto o teor de sólidos totais ideal é entre 14 e 16 g em 100 g de leite. O aumento do teor de sólidos pode ser conseguido através da adição de sólidos ao leite, como leite em pó desnatado, caseinatos, concentrados proteicos de soro ou de leite. No caso de iogurte batido com frutas pode-se adicionar sacarose (TAMIME et al., 2006). O aumento do teor de sólidos pode também ser alcançado removendo-se a água do leite pela evaporação ou ultrafiltração. A padronização do conteúdo de matéria gorda depende do tipo de iogurte que se deseja produzir, com creme, integral, parcialmente desnatado ou desnatado (BONG & MORARU, 2014).

O aumento do teor de sólidos totais do iogurte é acompanhado do aumento na viscosidade aparente do produto, o que reflete, por sua vez, no aumento do tempo de coagulação devido a maior interação dos sólidos com a água, que desta forma estaria menos disponível para o crescimento bacteriano (WU et al., 2009; PENNA, CONVERTI & DE OLIVEIRA, 2006). Assim, a escolha da quantidade de fortificação de matéria seca no leite deve ser considerada como um dos principais fatores que afetam as propriedades

reológicas do iogurte e deve ser corrigida antes do tratamento térmico. Segundo Tamime & Robinson (1999), a consistência melhora quando o conteúdo de sólidos totais do leite aumenta de 12 a 20%, porém somente uma pequena diferença de consistência é alcançada quando o conteúdo de sólidos totais aumenta entre os valores 16 a 20%. Assim, há pouco interesse no uso de concentrações acima de 16%, visto que nessa faixa de concentração, os resultados de consistência são semelhantes aos resultados utilizando valores maiores. A mistura devidamente padronizada de acordo com o produto desejado é submetida à homogeneização, que tem por finalidade promover a mistura de todos os ingredientes e a redução do tamanho dos glóbulos de gordura. Com este processo, impede-se a separação da gordura do leite da sua fase aquosa, que poderia ocorrer especialmente durante a fermentação ou durante o armazenamento do iogurte. Essa etapa reduz o diâmetro dos glóbulos de gordura, que passam a ter tamanhos médios  $< 2,0 \mu\text{m}$ . Além de evitar a separação de gordura no produto, a homogeneização melhora a textura do produto final. É conduzida com o leite aquecido ( $60\text{-}70^\circ\text{C}$ ) para que toda a gordura esteja líquida, facilitando o processo, e a pressão utilizada varia de 15-20 Mpa. Os lipídios são insolúveis em água e, portanto, existe uma tensão interfacial entre as fases em que os lipídios são dispersos em um meio aquoso. Devido à tensão interfacial, espera-se que as fases de óleo e água se separem rapidamente no leite. No entanto, essa separação é evitada pelos agentes de superfície que formam um filme ao redor de cada glóbulo de gordura e reduz a tensão interfacial, conhecido como membrana do glóbulo de gordura do leite (MGGL) (FOX et al., 2015). A composição química da membrana é razoavelmente bem estabelecida. A membrana possui uma fração proteica (41% da membrana), em sua maioria glicoproteínas e é formada por fosfolipídios (21%), e, através destes componentes e da membrana do glóbulo de gordura como um todo, que o leite se comporta como uma emulsão. A estabilidade da emulsão de gordura do leite depende fortemente da integridade das membranas dos glóbulos de gorduras e, essa membrana é bastante frágil, sendo alterada durante as operações de processamento de laticínios, principalmente pela homogeneização (LEE & SHERBON, 2002).

Reduzir o diâmetro médio dos glóbulos de gordura para  $1 \mu\text{m}$  resulta em um aumento de quatro a seis vezes na interface gordura, o que torna insuficiente a quantidade de membrana natural para revestir a superfície dos glóbulos que agora estão menores, porém em quantidades maiores, o que aumenta a área superficial a ser coberta pela membrana. Consequentemente, os glóbulos do leite homogeneizado são revestidos por uma nova membrana para equilibrar novamente o sistema, e esta consiste principalmente

de caseína (93%). A membrana do leite homogeneizado contém um valor proteico que é consideravelmente mais alto do que o nível de proteína na membrana natural (WILBEY, 2011, FOX et al., 2015).

Huppertz (2011) comparou os efeitos de diferentes pressões, convencionais e altas, na homogeneização do leite e observou que se pode atingir até 400 Mpa pressão, sendo que nas pressões mais altas de homogeneização se obtém de glóbulos de gordura consideravelmente menores do que na homogeneização convencional (10-30 Mpa). Esse comportamento pode ser explorado para a obtenção de produtos obtidos por coagulação ácida, como o iogurte, visto que os pequenos glóbulos de gordura no leite homogeneizado à alta pressão são promissores para melhorar a textura dos produtos.

Após a homogeneização a mistura deve ser imediatamente submetida ao tratamento térmico e os binômios usualmente utilizados são de 80–85°C por 30 minutos ou 90-95°C por 5–10 minutos (TAMIME et al.,2006). O tratamento térmico intenso, além de garantir a segurança do produto, promove a desnaturação das proteínas do soro de leite, que representam cerca de 20% das proteínas do leite bovino, são proteínas globulares típicas, solúveis, com altos níveis de estruturas secundárias e terciárias, e são, portanto, suscetíveis à desnaturação por vários agentes, incluindo o calor. O aquecimento acima de 70 °C leva a desnaturação das proteínas do soro promovendo uma série de interações proteicas tanto na fase coloidal quanto na sérica (WALSTRA et al.) Particularmente, a desnaturação da  $\beta$ -lactoglobulina, principal proteína do soro, resulta na exposição dos resíduos de sulfidril e/ou dissulfeto levando à formação de complexos de  $\beta$ -lactoglobulina- $\kappa$ -caseína, através de ligações dissulfeto (-S-S-), que favorece a reticulação da malha proteica e sua mais fácil agregação durante a acidificação e formação do gel, o que irá, conseqüentemente, melhorar a textura do produto final e aumentar a sua capacidade de retenção de água, evitando a sinérese (TAMIME e ROBINSON, 2007; LUCEY, 2001). As caseínas compreendem cerca de 80% das proteínas do leite e consistem de quatro proteínas principais:  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína, presentes no leite como partículas coloidais, conhecidas como micelas, as quais possuem elevada estabilidade térmica, o que permite seu tratamento a temperaturas elevadas (MEDEIROS et al., 2015; FOX et al.,2015).

Do ponto de vista tecnológico, a combinação de tratamento térmico intenso e homogeneização favorece a estabilidade físico-química do gel. A desnaturação das proteínas do soro e sua interação com as caseínas presentes na superfície da micela, resulta em uma micela maior, com maior estabilidade no gel do iogurte, que se torna mais

firme, diminuindo o risco de sinérese. Por outro lado, a homogeneização modifica a estrutura e composição da MGGL, que passa a ser composta basicamente por micelas de caseína. Assim, quando ocorre a desestabilização da micela de caseína e sua consequente precipitação, os glóbulos de gordura do leite passam a fazer parte de rede proteica, ligados quimicamente, e não somente presos mecanicamente à malha proteica (TAMIME & ROSBON 1999). Resumidamente, a combinação de tratamento térmico e homogeneização têm um efeito profundo nas características reológicas do iogurte e na sua capacidade de retenção de água (HARTE et al., 2003).

Segundo Castro (2002), o binômio tempo x temperatura pode variar, mas deve garantir a destruição dos microrganismos patogênicos e a maioria das células vegetativas de todos os microrganismos presentes no leite, de forma a reduzir ao mínimo os microrganismos que possam competir pelo substrato disponível, favorecendo, conseqüentemente, o desenvolvimento da cultura láctea do iogurte que será adicionada em seguida para a fermentação da mistura. Célia et al. (2017) elaborou iogurtes utilizando leite cru, leite pasteurizado e leite UHT e verificou que o tempo de incubação para atingir um pH de 4,6 foi de 460 minutos para os iogurtes produzidos com leite pasteurizado e UHT, e de 280 minutos para o produzido com leite cru, o que pode ser explicado pela presença de diversos outros microrganismos no leite que não foi tratado termicamente. O menor tempo para que ocorresse o abaixamento do pH durante a fermentação do leite cru indica a importância do tratamento térmico para eliminar a concorrência de bactérias ácido lácticas que não são adicionadas intencionalmente.

Após o tratamento térmico, o leite será resfriado e a cultura láctea comercial composta de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* será adicionada. Ambas as bactérias são homofermentativas, produzindo o ácido láctico como produto predominante. São também termofílicas, ou seja, sua temperatura ótima de desenvolvimento se encontra entre 37-45°C, sendo que a temperatura de inoculação usualmente empregada para o iogurte é a de 42°C, onde são obtidos iogurtes com géis viscosos, firmes e com propriedades de resistência a sinérese interessante. (TAMIME et al., 2006).

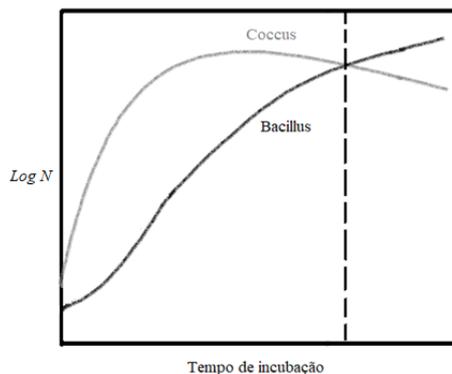
As bactérias ácido lácticas adicionadas irão metabolizar a lactose em ácido láctico majoritariamente. O primeiro passo no metabolismo da lactose é o seu transporte para o interior da célula das bactérias e no caso da cultura do iogurte, esse sistema envolve proteínas citoplasmáticas (permeases) que translocam o açúcar para a célula sem modificação química. Dessa maneira, a permease da lactose que está situada na

membrana citoplasmática da célula, transloca a lactose juntamente com prótons para o citoplasma, através de um sistema de transporte ativo. A energia é fornecida na forma de uma força motriz de prótons desenvolvida pela ATPase que hidrolisa o ATP. No interior da célula, a lactose é hidrolisada em glicose e galactose pela ação da enzima  $\beta$ -galactosidase. Como essas bactérias não metabolizam a galactose, uma única permeação transmembranar transloca simultaneamente moléculas de lactose para o citoplasma e moléculas de galactose para fora da célula. Além disso, esses microrganismos também estão bem adaptados em usar a caseína como fonte de nitrogênio, pois são capazes de hidrolisar essa proteína e os peptídeos derivados para satisfazer suas necessidades de aminoácidos (MOZZI et al., 2016). A galactose formada pela decomposição da lactose não é convertida por nenhuma bactéria do iogurte. Dessa maneira, a concentração de galactose aumenta conforme o teor de lactose diminui. A galactose remanescente forma, com outros glicídeos, cadeias de polissacarídeos que são parcialmente secretados no iogurte e, então, chamados de exopolissacarídeos e desempenham um papel importante na consistência do iogurte (WALSTRA; WOUTERS & GEURTS, 2006; ZANNINI et al., 2016).

As culturas lácteas agem sinergicamente e ambos, cocos e as bacillus contribuem significativamente nas propriedades finais do iogurte. Ambas as espécies devem estar presentes em grande número no produto e, portanto, na adição inicial da cultura. O crescimento de cocos e bastonetes em iogurte incubado a 45° C adicionado de 2,5% de inóculo é apresentado na Figura 1. Inicialmente, os lactobacillus, por serem mais proteolíticos, crescem mais rapidamente no leite, sendo capaz de hidrolisar as caseínas e consequentemente liberar aminoácidos e peptídeos no meio. Os peptídeos liberados favorecem o desenvolvimento dos cocos, que em contrapartida irão metabolizar a lactose em ácido láctico, além do gás carbônico e ácido fórmico, que são compostos que favorecem o crescimento do lactobacillus, que, por sua vez realizará a fermentação da lactose homofermentativamente, gerando ácido láctico como produto principal (WALSTRA; WOUTERS & GEURTS, 2006).

Devido a mútua estimulação durante o crescimento combinado das bactérias do iogurte no leite, o ácido láctico é produzido mais rapidamente do que quando se utilizam culturas puras individuais, reduzindo assim o tempo de fermentação e de fabricação do iogurte. Os compostos essenciais para o desenvolvimento de ambas as espécies se tornam disponíveis quando os bastonetes começam a se desenvolverem mais rapidamente por causa dos fatores de crescimento ( $\text{CO}_2$  e ácido fórmico) formados pelos cocos, como

resultado, a proporção original é recuperada. O iogurte neste momento deve ter atingido a acidez desejada (CHANDAN et al., 2013). Os fatores como porcentagem de inóculo adicionado, bem como a temperatura e tempo de incubação, podem afetar o equilíbrio da cultura láctica e, conseqüentemente, o desenvolvimento das características desejáveis no produto final.



**Figura 1:** Crescimento de cocos e bastonetes em iogurte fermentado a 45 °C em leite. A porcentagem de inóculo é igual a 2,5. N = contagem em ml<sup>-1</sup>. Fonte: Adaptado de Walstra; Wouters & Geurts (2006).

A porcentagem usual de cultura adicionada é de 2,5%. Aumentar essa porcentagem significa aumentar a taxa de produção de ácido, o que leva ao aumento da acidez, e, conseqüentemente a concentração dos cocos será diminuída, resultando em um número maior de bacilos, visto que eles possuem maior resistência a acidez. Lee & Lucey (2004) estudaram os efeitos na taxa de inoculação sobre o tempo de gelificação (até o pH 4,6), e verificaram que o tempo foi de 180 minutos e 119 minutos quando a taxa de inoculação aumentou de 0,5% para 4%, respectivamente, sugerindo que a menor taxa de inóculo favoreceu o desenvolvimento dos cocos, já que a produção de ácido foi mais branda, necessitando de tempo maior para fermentação e coagulação. A diminuição do tempo de fermentação está relacionada ao favorecimento do desenvolvimento dos bacilos com o aumento da taxa do inóculo, visto que essa cepa tem uma maior capacidade de produção de ácido láctico, diminuindo o tempo para se alcançar o ponto isoelétrico da caseína.

A temperatura de incubação afeta a proporção da cultura láctea mista inicial, pois os bacillus têm maior tolerância a temperaturas mais altas e o cocos tem uma temperatura ótima de crescimento ligeiramente maior que os bacillus. A temperatura ótima de crescimento de *Streptococcus thermophilus* situa-se entre 40 e 45°C, atingindo um mínimo a 20°C e um máximo a 50°C. Para *Lactobacillus bulgaricus*, a temperatura ótima do crescimento situa-se entre 40 e 43°C, atingindo um mínimo a 22°C e um máximo a

52,5°C. Quando juntas, a temperatura ótima de crescimento destas duas bactérias situa-se entre 40 e 45°C, sendo usualmente a de 42 – 43°C, devido a estas diferenças, principalmente nas temperaturas mínima e máxima que cada microrganismo suporta. Temperaturas de incubação maiores ou iguais a 45°C mudará a proporção em favor dos bastonetes e temperaturas mais baixas irão favorecer a concentração de cocos. Obviamente, uma proporção inicial correta entre as espécies pode ser mantida, ou ser recuperada, se necessário, pela seleção adequada das condições de propagação (LOVEDAY et al.,2013).

Wu et al. (2009) analisaram a influência da temperatura na produção de iogurte e observaram que a baixa temperatura de fermentação (35 a 39,5°C) atrasou o tempo de gelificação, mas resultou em maior viscosidade aparente. Segundo os autores, esse comportamento foi observado devido baixa quantidade e ao desenvolvimento retardado dos bacilos nestas condições de temperatura de fermentação. Com isso, a produção de ácido láctico realizada majoritariamente pelos bacilos declina, o que resulta no maior tempo para gelificação, porém, com maior viscosidade, já que a sinérese ou o gel menos firme é resultado da presença do ácido láctico em excesso, que resulta na desestatização da rede de formação de gel do iogurte.

No geral, acidez de 0,9% de ácido láctico e pH de 4,6 são utilizados para indicar o final da fermentação. O gel formado é irreversível e classificado como gel ácido. A produção de ácido láctico resulta em redução da carga superficial das micelas de caseína, negativamente carregadas. Inicialmente, no pH do leite (pH 6,7), as micelas de caseína encontram-se estáveis. Essa estabilidade é resultado do impedimento estérico, da repulsão eletrostática e da camada de hidratação. Com o abaixamento do pH, que se aproxima de seu ponto isoelétrico (pH 4,6), ocorre mudança na carga superficial das micelas, o que permite que as mesmas se agreguem através de ligações hidrofóbicas e eletrostáticas. O impedimento estérico permanece devido aos  $\kappa$ -"cabelos" da micela de caseína. Quando o leite é tratado termicamente antes do processo fermentativo, a agregação das partículas inicia a formação do gel no pH  $\cong$ 5,3 e essa diferença se dá porque a principal proteína de soro de leite, a  $\beta$ -lactoglobulina, passa a estar agregada as micelas  $\kappa$ -caseína e, devido a maior sensibilidade destas a desnaturação por pH ácido, a agregação e geleificação se inicia num valor mais alto de pH. São essas novas partículas de proteínas caseína-soro de leite que iniciam a geleificação (LUCEY et al., 2001; REMEUF et al., 2003).

Na sequência, o produto formado deve ser imediatamente resfriado. O resfriamento é uma etapa crítica na produção de iogurte, e tem a finalidade de reduzir a

atividade metabólica da cultura, controlando deste modo a acidez do iogurte. É recomendado que ocorra um pré-resfriamento a 20-25°C e, numa segunda etapa, seja resfriado em 5° C, devendo assim ser mantido durante toda sua vida de prateleira. O resfriamento lento, em duas etapas, permite melhor contração e estabilização do gel recém-formado. No caso do iogurte firme, após a coagulação e resfriamento na própria embalagem o produto está pronto para a comercialização. No caso dos iogurtes batido ou líquido o iogurte está pronto para ser acrescido de outros ingredientes e envasado. Mesmo mantido sob refrigeração, a atividade microbiana continua lentamente e a pós-acidificação do iogurte é o principal fator que limita sua vida de prateleira, uma vez que afeta a viabilidade dos microrganismos e as características sensoriais do produto (DONKOR et al., 2006).

Ao final do processo, o iogurte apresentará características sensoriais únicas, devido aos compostos produzidos durante a fermentação das culturas lácticas. Majoritariamente tem-se o ácido láctico, visto que a maior parte da glicose é decomposta de maneira homofermentativa formando o ácido láctico. As transformações da lactose e do citrato pelas bactérias ácido lácticas produzem compostos aromatizantes, como ácido láctico, acetaldeído, diacetil, acetoína e etanol. Os álcoois do iogurte podem subsequentemente combinar-se com os ácidos livres para formar ésteres como acetato de etila e acetato de butila (CHENG, 2010) e os acetaldeídos são componentes essenciais para a característica do aroma de iogurte, sendo que a maior parte é formada pelos bacilos (WALSTRA; WOUTERS & GEURTS 2006).

## **2.2. Iogurte tratado termicamente**

Segundo Tamime et al. (2006), um tratamento térmico pós-fermentação do iogurte prolonga a vida de prateleira do produto, uma vez que a aplicação de calor destrói bolores e leveduras e as bactérias da cultura láctica utilizada. A destruição dos microrganismos utilizados no processo de fermentação pode, em alguns países, causar controvérsia uma vez que conflita com a definição de iogurte, que estabelece que o produto deve conter uma quantidade abundante e viável bactérias ácido lácticas durante toda a vida de prateleira. Diante disso, é importante ressaltar que após ter sido submetido ao tratamento térmico, o produto já não pode mais ser designado como iogurte, visto que perdeu a viabilidade de suas bactérias ácido lácticas. Dessa maneira, geralmente são chamadas de bebida à base de iogurte ou bebidas fermentadas, ou iogurte pasteurizado e UHT.

Considerando a baixa capacidade de retenção de água do gel ácido, a manutenção de sua estabilidade durante o tratamento térmico requer a adição de agentes estabilizantes. Assim, para a fabricação do iogurte tratado termicamente, após a fermentação, as etapas de processo incluem a adição do agente estabilizante, a homogeneização da mistura seguido do tratamento térmico. A adição de estabilizantes geralmente ocorre na proporção de 1%, sendo a pectina, carboximetilcelulose, goma guar, carragena e amidos os mais comuns (TAMIME & ROBSON 1999). A homogeneização, geralmente entre 15 e 20 Mpa de pressão, é necessária para dispersar os estabilizantes e o tratamento térmico tem a finalidade para prolongar sua vida útil do produto. O tratamento térmico empregado pode ser por pasteurização a (75°C/20segundos) ou por processamento UHT (110°C/5segundos), e neste caso, após o resfriamento, o produto deve ser envasado assepticamente. (WALSTRA; WOUTERS & GEURTS, 2006). O produto pasteurizado deve ser mantido sob refrigeração, enquanto o produto esterilizado e embalado assepticamente pode ser mantido à temperatura ambiente.

A extensão da vida de prateleira do iogurte aplicando diversos binômios de tempo e temperatura é estabelecida há algum tempo na literatura. McKenna (1987) utilizou o binômio de 85°C/20seg. e alcançou uma bebida de iogurte com vida de prateleira de 3 meses estocados em 37°C. Güldeş & Atamer (1995) avaliaram três binômios diferentes de temperatura x tempo (70°C sem tempo de retenção, 70°C/15 min. e 70°C/30 min.) de iogurtes produzidos com misturas padronizadas com 15% de sólidos totais e 0,6% do estabilizante Gelodan, que é uma mistura de amido, pectina, gelatina e proteínas do leite. Após o tratamento térmico, os iogurtes pasteurizados foram armazenados a 4 e 20 ± 1 °C, sendo que os armazenados sob refrigeração (4±1° C) apresentaram vida de prateleira de 60 dias, enquanto que os armazenados a 20 ± 1°C tiveram vida de prateleira de 30 dias. Ambos os tratamentos foram eficientes para inibir a pós-acidificação dos iogurtes e o que definiu e limitou a vida de prateleira dos diferentes produtos foram as propriedades sensoriais, sendo inclusive perceptível a separação de fases nas amostras armazenadas a 20 ± 1 °C. As mesmas tiveram uma diminuição considerável da viscosidade ao longo do tempo e a formação de sinérese a partir de 30 dias de armazenamento, o que não foi observado para os iogurtes armazenados sob refrigeração (4 ± 1 °C).

Aneja et al. (2002) detalharam a produção de lassi, uma bebida de iogurte popular na Índia e no Paquistão que pode possuir sabor salgado, obtido através da adição de certas especiarias, ou sabor doce obtido através da adição de açúcar. Os autores também descrevem como o processamento UHT, seguido de envase asséptico, pode ser utilizado

para estender o prazo de validade dessa bebida, que alcança meses de validade sem necessidade de armazenamento sob refrigeração. Para tal, após a fermentação e adição de especiarias ou açúcares, o lassi foi homogeneizado a 23 Mpa (2000 psi), tratado termicamente a 135-145°C por 1-5 segundos e embalado assepticamente utilizando equipamento padrão e adequado.

Outras tecnologias têm sido exploradas como uma alternativa ao tratamento térmico do iogurte para aumentar sua vida de prateleira. Walker et al. (2006) avaliaram o efeito da alta pressão isostática em iogurte de amora. Imediatamente após o tratamento (550 MPa), a contagem de bacilos reduziu 7 ciclos log, passando de  $2,5 \times 10^9$  para  $2,5 \times 10^2$  UFC/mL. Durante 40 dias de armazenamento a 5 e 25°C, a contagem de bacilos foi indetectável. O tratamento por alta pressão foi eficaz para a eliminação de bolores e leveduras, pois nenhum crescimento foi observado durante o armazenamento de 60 dias em nenhuma das temperaturas avaliadas.

### **2.3. Adição de estabilizantes em iogurtes e seus derivados**

Os estabilizantes ou hidrocolóides são comumente adicionados em iogurtes e suas bebidas, com dois principais objetivos: ligar a água livre e melhorar a textura (HUSSEIN et al., 2011). Os hidrocolóides são polímeros de cadeia longa e hidrofílicos que se dispersam na presença de água, uma vez que interagem fortemente com as moléculas de água vizinhas por meio de ligações de hidrogênio e também se unem umas as outras, formando redes emaranhadas que modificam a textura, propriedades reológicas e viscosidade do sistema, formando géis ou promovendo um espessamento, mesmo em baixas concentrações (LI&NIE, 2016; DICKINSON, 2018).

Diversos estabilizantes podem ser adicionados aos leites fermentados, segundo a legislação brasileira. Entre eles, os mais frequentemente utilizados são os amidos, pectina, gelatina, goma guar, goma arábica, carragena, goma xantana, carboximetilcelulose e proteína de soro de leite concentrados (BRASIL, 2007; CHANDAN et al., 2013)

Um iogurte pode ser preparado sem a adição de estabilizantes, entretanto, a sedimentação dos sólidos não gordurosos acontecerá de forma inevitável, principalmente após a primeira semana de armazenamento. Esse fenômeno acontece em virtude da agregação das proteínas que ocorre durante a acidificação resultante do processo fermentativo, que se tornam pesadas e com tendência a sedimentação, acarretando na formação de sinérese (TAMIME et al., 2006; BABER SOHAIL et al., 2014). Segundo

Nguyen et al. (2017), a adição do estabilizante é indispensável para manter a estabilidade dos géis ácidos tratados termicamente após o estágio de fermentação.

A eficiência do estabilizante adicionado ao iogurte e seus derivados é avaliada pela sua solubilidade no baixo pH e nas temperaturas nas usuais do processamento, por não conferir sabor ao produto e pela sua capacidade de retenção de água (GAWAI, MUDGAL & PRAJAPATI, 2017). A carboximetilcelulose (CMC) atende todas essas características, visto que é um polissacarídeo hidrocolóide composto por polímeros derivados naturalmente da celulose, é solúvel em água quente ou fria, sendo também eficaz em altas temperaturas de processamento. Sua função principal é a de agente espessante e agente de ligação em meios aquosos, viabilizando, dessa maneira, a estabilização de sistemas úmidos, como os leites fermentados (SAHA & BHATTACHARYA, 2010). A CMC é adicionada frequentemente em iogurtes e seus derivados, pois a mesma interage com a caseína próximo ao seu ponto isoelétrico que é também o pH de formação do gel característico do iogurte, produzindo, nessas condições, um complexo solúvel, sem interferir na ordenação da estrutura. O complexo CMC-caseína é estável sob aquecimento e a sua concentração recomendada é de 0,5% (DICKINSON, 2018; TAMIME & ROBINSON, 1999).

Du et al. (2007) avaliaram a carboximetilcelulose como estabilizante para evitar a floculação das proteínas em bebidas lácteas acidificadas. Os resultados indicaram que a carboximetilcelulose desempenhou um papel fundamental na estabilidade das micelas de caseína em pH baixo. Isso porque a adsorção de CMC ocorreu abaixo de pH 5,2, o que acarretou em uma estabilização do sistema através de ligações entre as micelas de caseína, provocando um aumento na viscosidade e, assim, contribuindo para evitar a precipitação das micelas de caseína. Janhøj, Frøst, Ipsen (2008) avaliaram a caracterização sensorial e reológica de iogurtes utilizando CMC e pectina como estabilizantes. Os resultados demonstraram que a adição de 0,5% de CMC destacou-se com maiores valores de viscosidade oral e propriedades reológicas quando comparada as bebidas que tiveram adição de concentrações menores de CMC (0,3%) e também quando comparado aos produtos adicionados de pectina (concentração de 0 a 0,5%). Isso ocorre em razão da CMC ser um hidrocoloide aniônico e interagir com micelas de caseína formando complexos solúveis com a proteína do leite a um pH baixo e aumentando a viscosidade, sem interferir na ordenação da estrutura, o que não ocorre com outros estabilizantes.

#### **2.4.Vida de prateleira do iogurte**

No iogurte, os parâmetros fortemente relacionados à definição do prazo de validade são o pH, acidez, viscosidade, contagem de bactérias ácido lácticas e aceitação sensorial. Portanto, é essencial monitorar estes parâmetros durante o armazenamento refrigerado do produto de forma a estabelecer sua vida de prateleira (ZHI et al., 2018). Outros defeitos podem ser causados por microrganismos contaminantes, principalmente bolores e leveduras. Os sabores indesejáveis geralmente são caracterizados como frutado, mofado, láctico ou amargo e, ocasionalmente, rançoso. Um limitante do sabor desejável do iogurte é geralmente alcançado em uma contagem de cerca de  $10^4$  UFC de leveduras e bolores por mL de produto. O crescimento desses microrganismos é determinado em grande parte pela quantidade de oxigênio disponível e, portanto, pelo volume do espaço livre no recipiente e pela permeabilidade ao oxigênio da embalagem. Obviamente, o produto é resfriado para inibir o crescimento dos microrganismos que causam esses defeitos, mas mesmo em temperaturas de geladeira, a acidificação e outras mudanças causadas pelos sistemas enzimáticos continuam ocorrendo de maneira lenta e contínua (TALWALKAR et al., 2004).

O aumento de acidez e redução do pH observados, defeito conhecido como pós-acidificação do iogurte, deve-se a atividade microbiana, especialmente da cultura láctica, que produz o ácido láctico mesmo em temperatura de refrigeração. Atualmente, o consumidor mostra uma preferência por iogurte com acidez leve (pH 4,2 a 4,4), e o desenvolvimento continuado da acidez prejudica especialmente a aceitação do iogurte desnatado, visto que o sabor ácido tende a ser mais pronunciado neste produto. O problema se agrava em pH abaixo de 4,0, já que a força do gel diminui, afetando a viscosidade do iogurte, resultando em separação de fases (sinérese) e morte celular dos microrganismos (CHANDAN et al., 2013; O'DONNELL & BUTLER, 2002; COSTA et al., 2016). Diante deste cenário, fica evidente que estratégias para diminuir a pós-acidificação do iogurte são de grande interesse para a indústria e para os consumidores.

Outra estratégia que envolve a seleção de estirpes seria buscar linhagens com alta produção de exopolissacarídeos (EPS). Os EPS são produzidos por bactérias do ácido láctico durante o estágio de fermentação, e sua produção em leites fermentados é uma alternativa interessante aos estabilizantes que normalmente são adicionados. EPS produzidos pelas bactérias ácido lácticas durante a fermentação interagem com a rede proteica aumentando a viscosidade e diminuindo a sinérese do produto. Adicionalmente, se ligam a água livre do sistema, tornando-a menos disponível para o desenvolvimento

das bactérias ácido lácticas. Esse conjunto de interações dos EPS produzidos durante a fermentação podem resultar na extensão na vida de prateleira do iogurte. Tanto os bacilos como os cocos utilizados para produção do iogurte possuem capacidade de produção de EPS, que podem contribuir para o aumento da viscosidade do produto final (MOZZI et al., 2016).

Estirpes de *Streptococcus thermophilus* com alta produção de EPS foram selecionados por Han et al. (2016) e combinados com cepas de *Lactobacillus bulgaricus* comerciais para fabricação de leite fermentado. Os autores observaram que o leite fermentado fabricado por esta combinação de microrganismos e cepas apresentou produção significativamente maior de EPS (423,05mg/L) e também maior viscosidade (2400Mpa), quando comparadas com uma cultura láctea comercial convencional (400mg/L de EPS e 1700Mpa de viscosidade). Segundo os autores, essa pode ser também uma estratégia utilizada para reduzir a quantidade de estabilizantes.

Uma outra estratégia para prolongar o prazo de validade deste alimento é utilizando antimicrobianos e antifúngicos, evitando desta maneira a contaminação ou desenvolvimento de bolores e leveduras durante sua estocagem. Shahbazi & Shavisi (2019) avaliaram o efeito da adição do extrato de orégano em diferentes concentrações (0%, 0,75%, 1% e 1,5%) no iogurte, durante o armazenamento refrigerado (4°C) por 30 dias. Todos os iogurtes apresentavam inicialmente pH 4,50 e acidez de 0,77% de ácido láctico e ao final da estocagem (30 dias a 4°C) o iogurte controle, sem adição do extrato, teve o pH reduzido para 4,19 e acidez aumentada para 0,97 % de ácido láctico, enquanto a amostra com adição de 1,5% do extrato de orégano manteve o pH de 4,50 e apresentou menor aumento da acidez (de 0,77 para 0,84% de ácido láctico). Os autores consideraram que a adição de extrato de orégano ainda permitiu o abaixamento do pH e aumento da acidez durante a estocagem, apesar destes fenômenos terem sido menos drásticos quando comparados com o iogurte controle (sem adição do extrato de orégano).

Segundo Teixeira et al. (2012), o mecanismo antibacteriano dos extratos de ervas está associado aos seus principais compostos, principalmente polifenólicos, capazes de interagir com a membrana citoplasmática das células bacterianas, o que pode levar a inibição do crescimento destas. Tabasco et al. (2011) avaliaram o efeito dos polifenóis da uva no crescimento de bactérias do ácido láctico e bifidobactérias e observaram que estirpes de *Streptococcus thermophilus* e diversas cepas de *Lactobacillus bulgaricus* mostraram sensibilidade aos extratos fenólicos testados, o que pode indicar uma inviabilidade das aplicações destes em iogurte.

Alhejaili et al. (2019) verificaram a influência de uma suspensão aquosa de mirra sobre a vida útil do iogurte. A mirra é um óleo essencial e aromatizante natural rico em polifenólicos que possuem atividade antibacteriana e antifúngica contra patógenos, porém quando aplicadas em iogurte, a contagem de células viáveis, bem como pH e acidez não diferiram significativamente dos iogurtes controle. Dessa maneira, as proporções utilizadas de mirra no estudo (0,1%), não foram eficientes para retardar a pós acidificação do iogurte, sendo ineficaz em prolongar sua vida de prateleira.

Devido a quantidade de reações que podem acontecer na estocagem do iogurte, estudos que predizem e analisam sua vida de prateleira de acordo com os principais parâmetros que interferem no seu prazo de validade são de interesse. Zhi et al. (2018) desenvolveram um modelo de previsão do prazo de validade de iogurtes comerciais e demonstraram que o mesmo não deve ser baseado somente em fatores microbiológicos, visto que a contagem de BAL decai somente próximo ao final da vida de prateleira (após 20 dias a 5°C), conforme a escassez de nutrientes. Segundo os autores, além dos parâmetros microbiológicos, os físico-químicos e sensoriais devem ser considerados para avaliar o prazo de validade dos produtos.

Mataragas et al. (2011), também desenvolveram um modelo preditivo para quantificar a deterioração do iogurte com frutas adquiridos diretamente de produtores e sugeriram que os parâmetros microbiológicos não puderam ser levados em consideração, pois durante os 56 dias de armazenamento a 5°C, a contagem de BAL reduziu somente de 8,7 para 6-7 log<sub>10</sub>UFC/g, ou seja, os valores de viabilidade ainda se encontraram dentro da legislação. Entretanto, a deterioração deste já era evidente, apresentando, por exemplo, formação de mofo na superfície, descoloração, odores e alterações no gel. Além disso, a acidez titulável (1,0 % ácido láctico) e o pH (4,25) permaneceram praticamente constantes durante os 56 dias de armazenamento a 5°C. Diante disso, a determinação do prazo de validade no estudo em questão, foi baseada na avaliação sensorial do parâmetro da aparência, através da observação aparecimento de deterioração evidente, demonstrando a importância do acompanhamento sensorial durante o armazenamento, onde, ainda que outras avaliações apresentem resultados aceitáveis, a aparência do produto indica por si só seu prazo de validade.

Resumidamente, a vida de prateleira de um produto pode ser definida pelo período de armazenamento em que o produto permanece próprio para consumo sob condições estabelecidas de temperatura, umidade relativa, luz e outras, sofrendo pequenas alterações que não afetam a sua qualidade sensorial, nutricional e a segurança do consumidor

(VITALI et al., 2010). No caso do iogurte, a vida de prateleira ainda é dependente do atendimento aos requisitos legais relacionados a acidez e viabilidade das bactérias durante a estocagem (BRASIL, 2007).

## 2.5. Microencapsulação de bactérias ácido lácticas

A encapsulação de microrganismos visando prolongar sua viabilidade e evitar sua interação com os componentes dos alimentos tem sido estudada em diferentes contextos. O conceito de microencapsulação baseia-se no modelo celular, no qual o núcleo é envolvido por uma membrana semipermeável que o protege do meio externo e ao mesmo tempo controla a entrada e a saída de substâncias na célula (JIZOMOTO et al., 1993; SHOJI et al., 2013). Essa estratégia tem sido utilizada para proteger o microrganismo, quer seja do meio adverso onde se encontra, quer seja durante a digestão para manter a viabilidade de microrganismos durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Diferentes técnicas de microencapsulação podem ser utilizadas na formação das microestruturas, sendo uma das principais técnicas atualmente explorada para microrganismos é a denominada *spray chilling*, *spray cooling* ou *spray congealing*. Essas nomenclaturas referem-se a mesma metodologia, as quais são variações do método convencional *spray drying* comumente utilizado na microencapsulação de compostos. Porém, no lugar de temperaturas elevadas para evaporação de solventes, o ar refrigerado é utilizado para a solidificação do material lipídico e consequente formação das partículas, que podem ser utilizadas como carreadores de diversos compostos (PEGG & SHAHIDI, 2007).

Na maioria das vezes, o método de microencapsulação por *spray chilling* utiliza compostos hidrofóbicos, ou seja, lipídicos como material de parede e compostos hidrofílicos como núcleo. Os materiais empregados como encapsulantes hidrofóbicos incluem as ceras e as gorduras de grau alimentício, enquanto os mesmos permitem menor difusão dos compostos hidrofílicos (MADENE et al., 2006). Portanto, as micropartículas procedentes desse processo são insolúveis em água e proporcionam propriedades físico-químicas adequadas para o encapsulamento de componentes com elevada hidroafetividade. Além disso, o uso de lipídios como materiais encapsulantes amplia as possibilidades de aplicação de partículas, explorando temperaturas ou a liberação mecânica da mesma. O agente ativo pode ser solúvel nos lipídios ou estar presente como partículas secas ou emulsões aquosas (GOUIN, 2004; ABBAS et al., 2012;).

Quando se utiliza um material lipídico como material de parede, o mesmo deve ser fundido a temperaturas acima do seu ponto de fusão para que seja possível a formação de uma suspensão com os microrganismos de interesse, a qual será bombeada (bomba peristáltica) através do bico atomizador e sendo pulverizada na câmara de resfriamento. Através de transferência de calor entre o ar frio e as gotículas lipídicas quente, as gotículas se solidificam antes de entrarem em contato com a parede da câmara de resfriamento. O pó cristalizado é recolhido e armazenado sob refrigeração para a estabilização das micropartículas. Essa tecnologia de encapsulamento é considerada de baixo custo e pode ser facilmente utilizada na fabricação de partículas em escala industrial (GOUIN, 2004; MARTÍN et al., 2015; BRATOVČIC et al., 2019).

Diferentes estudos foram conduzidos para microencapsulação de microrganismos probióticos utilizando *spray chilling* como técnica de encapsulação e lipídios como material de parede. A encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* utilizando gordura vegetal como material de parede foi avaliado por Silva et. al (2018) e Bampi et. al (2016), enquanto Pedroso et. al (2013) avaliaram a utilização da manteiga de cacau como material de parede. Mistura interesterificada de óleo de palmiste com óleo de palma totalmente hidrogenado foi utilizada para encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* (OKURO et al., 2013) e mistura interesterificada de óleo de palmiste com óleo de palma foi utilizado para encapsular *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* e *Lactobacillus acidophilus* por Pedroso et al. (2012). No geral, os autores indicaram que a técnica de *spray chilling* é sutil o suficiente para não afetar a viabilidade dos microrganismos e que a instabilidade das partículas armazenadas sob refrigeração (5 e 7°C) está relacionada a composição do material de parede e aos microrganismos utilizados.

A maioria dos óleos vegetais em seu estado natural se apresenta líquido, o que limita sua aplicação como material encapsulante por não apresentarem características plásticas desejáveis (MING et al., 2008). Além disso, quando se modifica óleos vegetais de composição homogênea através da total hidrogenação para se aumentar o ponto de fusão, observa-se que sua aplicação é limitada, pois em função do alto ponto de fusão, em média 65 °C (RIBEIRO et al., 2013), os *hardfats*, termo utilizado para denominar os óleos vegetais totalmente hidrogenados, podem apresentar aspecto ceroso e sensação desagradável na boca (RIBEIRO et al., 2010). Assim, o ponto de fusão do material lipídico utilizado como material de parede é importante tanto para estrutura da partícula como para sua aplicação tecnológica e nos trabalhos apresentado acima variaram de 36,5

°C para manteiga de cacau (PEDROSO et. al. 2013) a 51 °C para gordura vegetal (BAMPI et. al, 2016).

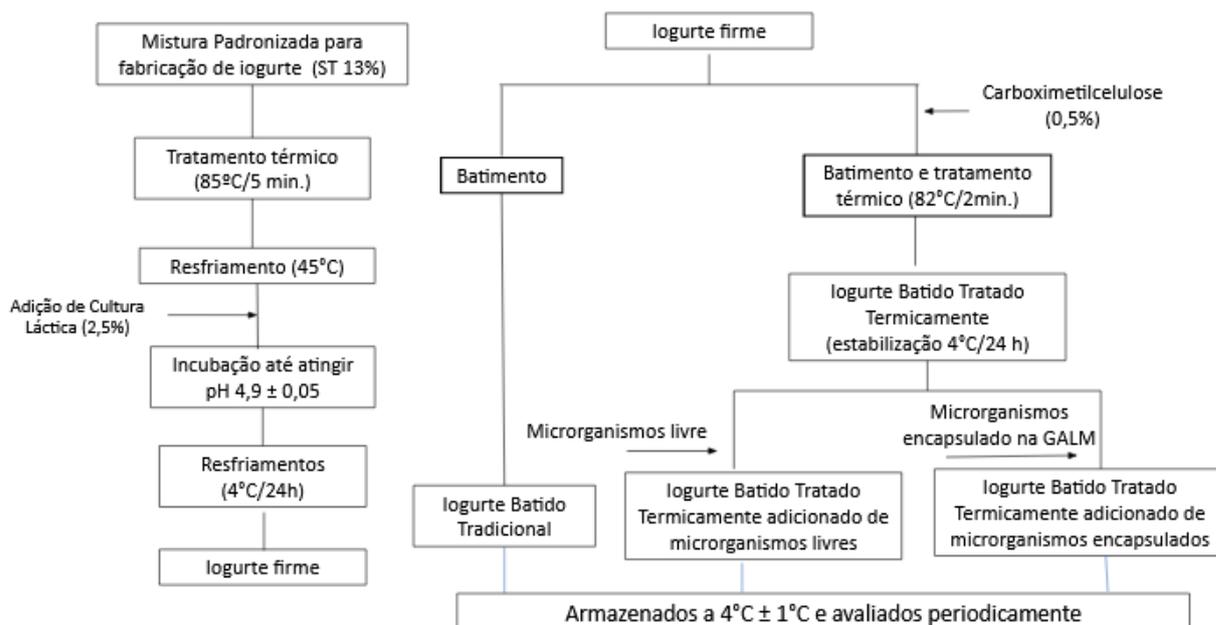
Neste contexto, a utilização da gordura do leite como material encapsulante pode ser uma alternativa interessante, já que ela se apresenta naturalmente plástica. Isso ocorre devido à vasta gama de ácidos graxos que compõem os triacilgliceróis presentes na gordura do leite, que derretem em uma ampla faixa de temperatura, entre -40 e 40 ° C, com uma grande fração de derretimento entre 10 e 20°C (MACGIBBON & TAYLOR, 2006). Tecnicamente, a gordura do leite é utilizada na sua forma anidra, uma vez que a sua utilização e manipulação são facilitadas nesta condição. A legislação brasileira (BRASIL, 1996) define a gordura anidra do leite (GAL) como um “produto gorduroso obtido a partir de creme de leite ou manteiga pela eliminação quase total da água e dos sólidos não gordurosos”. A gordura anidra do leite (GAL) deve apresentar no mínimo 99,7% de gordura, e teores máximos de 0,2% de umidade, 0,35 de índice de peróxidos (meq/kg matéria gorda) e 0,40 de acidez (g de ácido oleico/100g de gordura).

Apesar de ser naturalmente plástica, a GAL apresenta limitações como material encapsulante devido ao seu ponto de fusão relativamente baixo, em torno de 36°C. No entanto, a gordura do leite modificada por hidrogenação total (QUEIRÓS, 2018) resultou em uma matriz lipídica com composição de ácidos graxos extremamente heterogênea, com maior estabilidade térmica e ponto de fusão de 46 °C. Além disso, quando o material foi avaliado para produção de micropartículas por *spray chilling*, os resultados indicaram a formação de micropartículas esféricas, com superfície lisa, que se mantiveram estáveis durante 90 dias de armazenamento a 5°C (QUEIRÓS, 2018). Durante o armazenamento a 5 ° C, essas micropartículas apresentaram menor tamanho e menor aglomeração quando comparado ao armazenamento em temperaturas mais elevadas (10 e 15°C), devido ao menor teor de gordura líquida no sistema, o que possivelmente dificultou a adesão de uma partícula à outra. Esses resultados sugeriram, mais uma vez, o potencial da gordura anidra do leite totalmente hidrogenada como um composto lipídico apropriado para compor material de parede na produção de micropartículas que possam envolver compostos ativos como material interno (QUEIRÓS et al., 2020). Esse potencial foi avaliado por De Paiva et al (2022) que encapsulou *Lactobacillus acidophilus* LA3 utilizando a técnica de *spray chilling* e a gordura anidra do leite modificada (GALM) como material de parede. Depois de estabilizadas, as micropartículas foram armazenadas a -18, 5 e 25 °C e os resultados demonstraram que independente da temperatura de armazenamento o *Lactobacillus acidophilus* LA3 apresentou alta viabilidade (contagens bacterianas superiores a  $2,8 \times 10^8$  UFC/g) após 60 dias, de de armazenamento.

### 3.0. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Esquema geral do trabalho

O esquema geral do trabalho é apresentado na Figura 2. Em linhas gerais, o iogurte firme foi fabricado pelo método tradicional utilizando-se cultura láctica composta de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*. Após a estabilização do gel sob refrigeração, o iogurte foi dividido em duas porções. Uma delas foi batida para a fabricação do iogurte batido tradicional, sendo em seguida armazenado a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ . A outra porção foi adicionada de carboximetilcelulose, batida e submetida ao tratamento térmico ( $82^\circ\text{C}/2\text{min.}$ ) com a finalidade de inativar os microrganismos da cultura láctica comumente responsáveis pela pós-acidificação do iogurte. Em seguida, o iogurte batido tratado termicamente foi subdividido em duas porções, sendo uma delas adicionada de microrganismo livres e a outra de microrganismos encapsulados por *spray chilling* utilizando gordura do leite modificada como material de parede. Da mesma forma, os produtos foram armazenados a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  e avaliados periodicamente quanto ao pH, acidez e viabilidade dos microrganismos. O experimento completo foi repetido três vezes.



**Figura 2:** Esquema geral de desenvolvimento do trabalho. ST = Sólidos totais. GALM = Gordura anidra do leite modificada.

### **3.2. Ativação dos microrganismos, preparo da cultura láctica e da suspensão de microrganismos**

Inicialmente, a cultura láctica liofilizada utilizada na produção dos iogurtes constituída de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* (YF-L812, Christian Hansen, Valinhos, Brasil) foi ativada (45°C/4 h) em leite em pó desnatado, reconstituído (11%) e esterilizado. Paralelamente, realizou-se também a ativação desta mesma cultura em meio caldo MRS previamente esterilizado a 37°C/8h. Em seguida, foi feita a centrifugação (2400 g /9 min) e lavagem das células com gordura anidra do leite (GAL) previamente fundida a 36°C. Esse procedimento foi repetido 3 vezes até obtenção de uma suspensão concentrada. Para cada processamento, foram preparadas duas suspensões que foram utilizadas para a encapsulação dos microrganismos e para a introdução dos microrganismos na forma livre no iogurte tratado termicamente.

### **3.3. Caracterização das matérias primas**

Todos os experimentos foram realizados utilizando o mesmo lote de leite UHT integral e de leite em pó desnatado que foram avaliados utilizando-se metodologias padrão de avaliação da composição centesimal (AOAC, 2006). O leite em pó desnatado utilizado apresentou a seguinte composição: gordura (1,62 ± 0,02%), sólidos totais (95,49 ± 0,12%), cinzas (7,64 ± 0,01%) e proteínas (33,20 ± 0,52%). O leite UHT integral apresentou pH 6,54 ± 0,01, acidez de 0,18 ± 0,01 % de ácido láctico, gordura (3,29 ± 0,01%), sólidos totais (12,04 ± 0,05%), cinzas (0,83 ± 0,02%) e proteínas (3,84 ± 0,05%). O leite UHT utilizado atendeu ao preconizado no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UHT (BRASIL, 1997), onde é estabelecido como requisitos o teor de gordura mínimo de 3,0 % (m/v), acidez titulável entre 0,14 e 0,18 g ácido láctico/100 mL e extrato seco desengordurado mínimo de 8,2 % (m/m).

### **3.4. Fabricação das micropartículas**

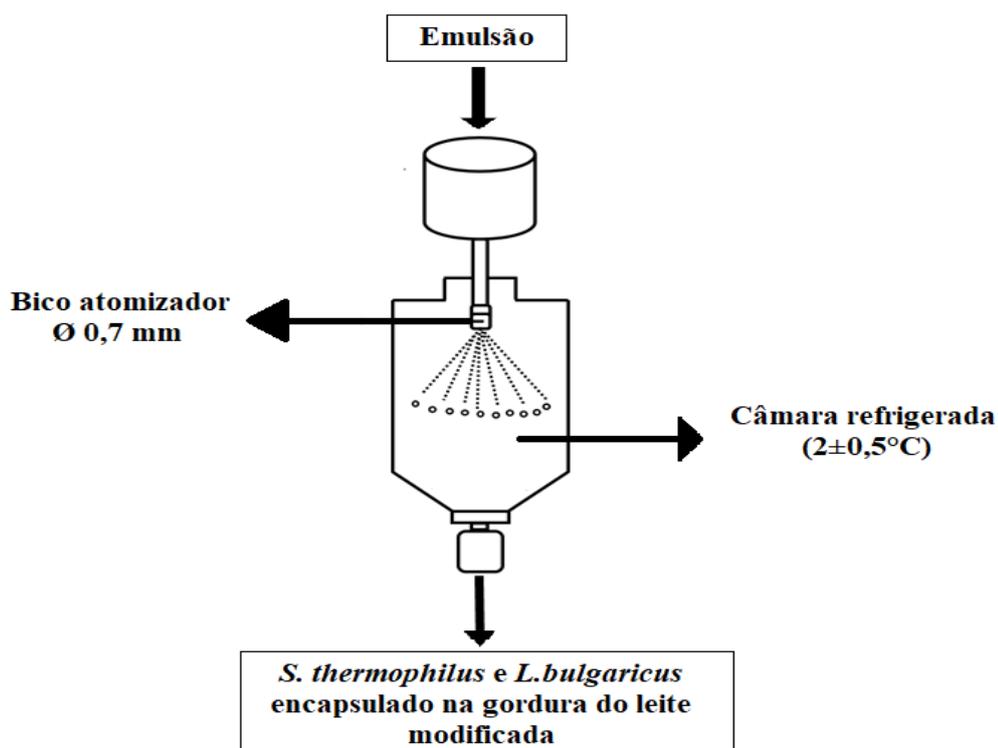
A Figura 3 representa o processo de produção das micropartículas, que foi realizado de acordo com o método descrito em Queirós et al. (2020), com modificações. Para o preparo da emulsão, inicialmente, a gordura do leite modificada foi completamente fundida a 50°C (96%) e adicionada da suspensão de microrganismos (4%). Essa mistura

foi homogeneizada em homogeneizador Ultraturrax a 7000 rpm por 60 segundos formando uma emulsão. Em seguida, a emulsão a 50 °C foi pulverizada em atomizador duplo fluido (diâmetro de 0,7 mm) a 1 bar de pressão em uma câmara resfriada ( $2\pm 1^\circ\text{C}$ ) com corrente de ar. Imediatamente ao final da pulverização, as micropartículas foram acondicionadas em embalagens metalizadas e mantidas a  $5^\circ\text{C}/24$  horas para estabilização.

A eficiência de encapsulação do *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* foi calculada segundo a resistência dos microrganismos ao processo de microencapsulação. Dessa maneira, foi realizada a enumeração de células viáveis antes do processo de encapsulação (na emulsão) e nas micropartículas estabilizadas  $5^\circ\text{C}/24\text{h}$  e a partir desses resultados e utilizando a equação 1 abaixo, calculou-se a eficiência:

$$\text{Eficiência de encapsulação} = \frac{N_t}{N_0} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde  $N_0$  foi a contagem de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* da emulsão e  $N_t$  foi a contagem deles após o processamento.



**Figura 3:** Fluxograma de produção das micropartículas.

### 3.5. Caracterização das micropartículas

Após a estabilização (5°C/24h), as micropartículas foram caracterizadas quanto ao tamanho, morfologia, comportamento térmico de fusão e contagem de bactérias ácido lácticas totais.

#### 3.5.1. Morfologia

A morfologia das micropartículas foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As micropartículas foram acomodadas em uma fita de carbono dupla face (Ted Pella, Inc., Redding- Estados Unidos) fixada em *stubs* de alumínio, seguindo a metodologia proposta por Okuro et al. (2013). As imagens foram captadas em microscópio do tipo mesa, TM-3000 (Hitachi High Technologies America, Inc) usando o modo Analy, com aumento de 200, 400 e 1000 vezes.

#### 3.5.2. Tamanho das micropartículas

O tamanho das micropartículas foi avaliado no analisador de partículas por difração de raio laser (Mastersizer 2000 - Malvern Instruments Ltda, Malvern, Reino Unido). As partículas foram dispersas em solução 1% de Tween 20 e o conteúdo do tubo de ensaio foi colocado na unidade de dispersão do equipamento, preenchida com a mesma solução, sob agitação constante a 1.750 rpm. A leitura foi feita após 5 minutos de agitação e o índice de obscuração utilizado foi de aproximadamente 3%

$$D_{4,3} = \frac{\sum_{i=1}^n n \cdot d_i^4}{\sum_{i=1}^n n \cdot d_i^3} \quad (\text{Equação 2})$$

$$Span = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:  $d_i$  é o diâmetro das partículas e  $n$  é o número de partículas. E  $d_{10}$ ,  $d_{50}$ ,  $d_{90}$  representam 10, 50 e 90% do volume cumulativo das partículas, respectivamente.

#### 3.5.3. Comportamento térmico de fusão

O comportamento térmico de fusão das micropartículas foi avaliado por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) utilizando DSC Q2000 (TA Instruments, EUA) com calibração por Lítio, conforme o método temperatura (AOCS Cj 2-95, 2009), com as seguintes condições: peso da amostra: aproximadamente 10 mg; aquecimento de

6°C, a uma taxa de 5 °C/ min, incluindo uma isoterma de 10 minutos para equilibrar a temperatura. Aproximadamente 10 mg de amostra foi pesada em placas de alumínio e recravadas hermeticamente. Inicialmente as micropartículas foram mantidas na temperatura de armazenamento (5 °C) por 10 minutos, seguido de aquecimento a uma taxa de 5 °C/min até 60 °C. Para avaliação dos resultados foram considerados os seguintes parâmetros: temperatura inicial de fusão, temperatura final de fusão, temperatura máxima de pico de fusão e entalpia de fusão

#### **3.5.4. Contagem de bactérias ácido lácticas totais**

As contagens de bactérias ácido lácticas totais das micropartículas foram realizadas conforme o descrito por da Silva et al. (2017) com adaptações. Inicialmente, as amostras foram submetidas a diluições em série que foram preparadas em solução de citrato de sódio 2%, aquecidas a 50°C e plaqueadas em profundidade e sobrecamada em meio MRS ágar previamente esterilizados. O plaqueamento foi realizado em duplicata e as placas foram incubadas invertidas, em atmosfera normal a 37°C por 48 horas. Após esse período, foi realizada a contagem do número de colônias.

#### **3.6. Fabricação do iogurte firme, iogurte batido tradicional, iogurte batido tratado termicamente e adicionado de microrganismos livres ou encapsulado**

Para fabricação do iogurte firme, inicialmente o leite UHT integral (3% do gordura) foi padronizado com 13% de sólidos totais, através da adição de leite em pó desnatado. Após a padronização, a mistura foi submetida ao tratamento térmico (85°C/5min.), resfriado a 45°C, inoculado com 2,5% de cultura láctica constituída de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* (YF-L812, Christian Hansen, Valinhos, Brasil) e incubada em BOD (45±1°C) para fermentação. Antes da incubação, uma porção da mistura padronizada foi separada, distribuída em tubos de rosca (50 mL) e colocada em banho-maria (45°C). Durante a fermentação, amostras foram retiradas em intervalos de 30 minutos para acompanhamento do pH e da acidez titulável. O tempo de fermentação foi considerado o necessário para que o pH atingisse  $4,9 \pm 0,05$ . Ao final da fermentação, os iogurtes foram resfriados em banho de gelo e armazenados sob refrigeração ( $4 \pm 1$  °C) por 24 horas para estabilização do gel.

No dia seguinte, o iogurte firme foi batido em batedeira da marca Arno durante 60 segundos em velocidade média, para a quebra parcial do gel e, logo após, foi dividido

em duas porções. A primeira porção (iogurte batido tradicional) foi acondicionada em tubos Falcon estéreis que foram manuseados somente em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar, hermeticamente fechados e armazenados sob refrigeração ( $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ). A segunda porção foi adicionada do estabilizante carboximetilcelulose sódica (0,5% p/p) e tratada termicamente a  $82^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos em banho maria com agitação lenta constante. O binômio do tratamento térmico (TT), bem como o estabilizante e sua concentração, foram definidos em testes preliminares. Após o TT, o iogurte foi resfriado e armazenado sob refrigeração ( $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) por 24h para a estabilização do gel e completo resfriamento.

No dia seguinte, o iogurte tratado termicamente, manuseado somente em câmara de fluxo laminar, foi novamente dividido em duas porções. Uma delas foi adicionada da suspensão de microrganismos livres para a obtenção do iogurte batido tratado termicamente e adicionado de microrganismos livres. A segunda porção foi adicionada de micropartículas contendo a cultura mista de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, previamente encapsulada utilizando a gordura do leite modificada como material de parede para a obtenção do iogurte batido tratado termicamente e adicionado de microrganismos encapsulados. A adição da suspensão de microrganismos livre ou encapsulados aos iogurtes batidos tratados termicamente foi realizada em câmara de fluxo laminar na proporção de 1% (p/p) e, logo após, foi acondicionada em tubos Falcon estéreis, hermeticamente fechados e armazenados sob refrigeração ( $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Durante o armazenamento refrigerado, a cada 10 dias, amostras do iogurte batido tradicional e dos iogurtes batidos tratados termicamente adicionados de microrganismos livres ou encapsulados foram avaliadas quanto à acidez titulável, expressa em % de ácido láctico, pH e contagem de bactérias ácido lácticas totais.

### **3.7. Caracterização físico-química das matérias primas, ingredientes e dos iogurtes**

O iogurte batido tradicional, o iogurte batido tratado termicamente adicionado de microrganismos livres ou de microrganismos microencapsulados, foram avaliados quanto gordura determinada gravimetricamente após extração em frascos de Mojonnier (AOAC, 2006; método 989.05), extrato seco total pelo método de secagem em estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  (AOAC, 2006; método 990.19), cinzas por incineração em forno mufla a  $550^{\circ}\text{C}$  (AOAC, 2006; método 945.46) e nitrogênio total pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC,

2006; método 991.20). A lactose calculada por diferença entre os demais constituintes sólidos do produto.

Para avaliar o efeito do TT sobre a contagem de bactérias ácido lácticas totais, antes e após o TT o iogurte batido tradicional foi avaliado quanto à contagem de bactérias ácido lácticas totais. Durante os 90 dias de estocagem sob refrigeração ( $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) o iogurte batido tradicional, o iogurte batido tratado termicamente adicionado de microrganismos livres ou de microrganismos microencapsulados foram avaliados quanto ao pH utilizando-se potenciômetro devidamente calibrado, acidez titulável (AOAC, 2006; método 947.05), expressa em % de ácido láctico e contagem de bactérias ácido lácticas totais. As análises foram repetidas em intervalos de 10 dias, até completarem 90 dias de estocagem refrigerada.

A viabilidade das culturas lácticas foi avaliada conforme descrito em 3.5.4., através do plaqueamento em profundidade e sobrecamada em meio MRS ágar segundo da Silva et al. (2017). Todo o material utilizado nas análises microbiológicas foi previamente esterilizado em autoclave, e as análises realizadas em câmara de fluxo laminar, onde foram feitas diluições em série preparadas em solução de citrato de sódio 2% aquecidas a  $50^{\circ}\text{C}$ . Em seguida realizou-se plaqueamento em profundidade e sobrecamada e as placas foram incubadas invertidas, em atmosfera normal a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 horas e, após esse período, foi realizada a contagem do número de colônias. O plaqueamento foi realizado em duplicata.

Os padrões estabelecidos pela legislação para acidez (máx. 1,5 g de ácido láctico/100g de produto) e viabilidade de bactérias ácido lácticas ( $\geq 10^7$  UFC/g de produto) foram utilizados como referência para estabelecer a validade do produto.

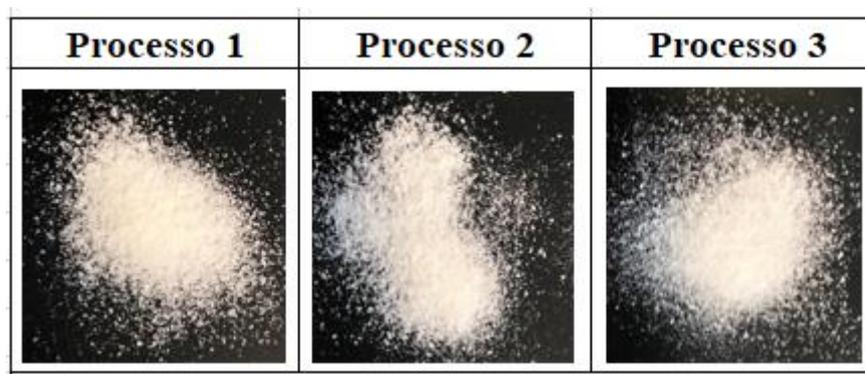
### **3.8.Delineamento experimental e análise dos resultados**

O delineamento experimental utilizado foi um esquema fatorial  $3 \times 9$ , em blocos completamente casualizados com três repetições. O efeito do tratamento sobre a composição físico-química e a contagem total de bactérias ácido lácticas do dia 0 dos iogurtes foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA). Os efeitos do tratamento (3 níveis de variação), do tempo de armazenamento (9 níveis de variação), bem como da interação desses fatores, sobre pH e acidez foram avaliados por ANOVA fatorial. Em caso de diferença, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey considerando-se nível de significância de 5%. Os dados foram tratados utilizando o software Statistica 10.0.

## 4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Produção e caracterização das micropartículas

As micropartículas lipídicas sólidas obtidas por *spray chilling* contendo a cultura láctea mista de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* estabilizadas a 5 °C por 24 horas apresentavam a mesma aparência de um pó fino e coloração esbranquiçada (Figura 4). Durante a fabricação, observou-se uma perda de 0,89 ciclo logarítmico na viabilidade das bactérias, que apresentaram contagem média na emulsão de  $11,70 \pm 0,13$  e nas micropartículas lipídicas sólidas de  $10,81 \pm 0,02$  ciclos logarítmicos, após 24h de estocagem a 5 °C, o que representa uma eficiência de microencapsulação do *Streptococcus thermophilus* e do *Lactobacillus bulgaricus* em GLM de 92,39%. Uma maior eficiência de encapsulação (98,15%) foi observada por De Paiva et al (2022) utilizando a mesma técnica (*spray chilling*) e o mesmo material de parede (GALM), entretanto com outro microrganismo, o *Lactobacillus acidophilus* LA3. Além da diferença do microrganismo, os autores adicionaram lecitina de soja (1%) durante o preparo da emulsão, o que pode ter favorecido a estabilidade da emulsão e a proteção ao microrganismo durante a encapsulação. Arslan-Tontul & Erbas (2017) relataram eficiência de 96% para a microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado por *spray chilling*, utilizando óleo de palma totalmente hidrogenado como material de parede. Os trabalhos mencionados relatam perdas não significativas de viabilidade dos microrganismos entre a emulsão e partículas estáveis, diferentes dos encontrados neste trabalho, o que pode indicar uma maior resistência ao processamento das bactérias lácteas envolvidas nos estudos citados quando comparadas a cultura mista de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* avaliadas neste estudo. Embora significativa ( $p < 0,0001$ ), do ponto de vista prático a redução na viabilidade celular é pouco importante, pois as partículas apresentaram ainda alta contagem celular ( $10,81 \pm 0,02$  ciclos logarítmicos). Fatores que podem ter afetado a viabilidade celular durante a produção das micropartículas são a temperatura de fusão da gordura utilizada no processo (50 °C), a agitação no Ultra-turrax e, também, o processo de fabricação do *spray chilling*, que submeteu a emulsão ao estresse mecânico e um choque térmico para sua solidificação durante o processo.



**Figura 4:** Aspecto visual das micropartículas lipídicas sólidas contendo *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* obtidas por *spray chilling*.

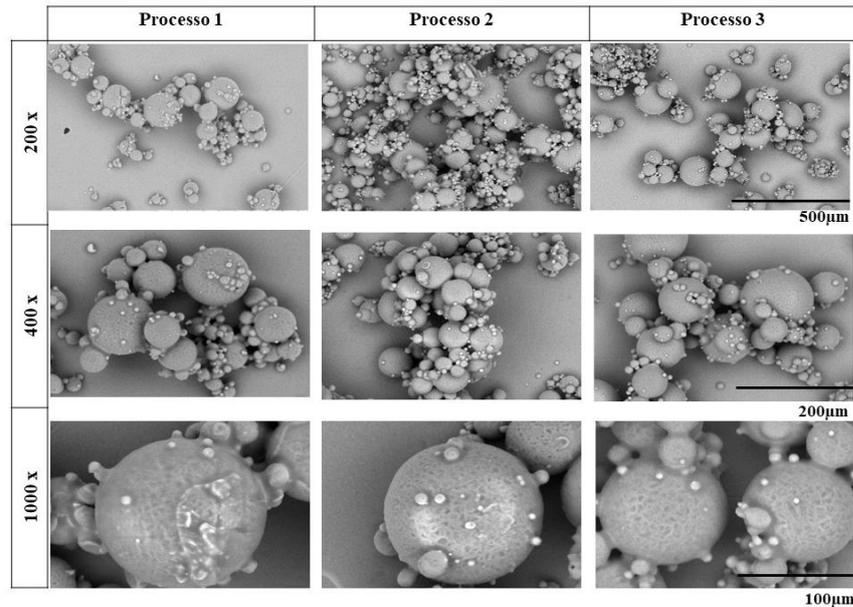
Em relação a morfologia, observa-se através das imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura (Figura 5) que as partículas apresentaram formato esférico, o que facilita sua incorporação em produtos alimentícios, reduzindo a superfície de tensão entre as micropartículas e o alimento (BAMPI et al., 2016) e superfície lisa que é favorecida pela hidrofobicidade do material de parede (GALM). Essas características são típicas de micropartículas obtidas por *spray chilling* (CONSOLI et al., 2016). Nos menores aumentos (200 e 400 x) é perceptível uma tendência a aglomeração, sendo que as micropartículas de menor tamanho se aderiram à superfície das de maior diâmetro, facilitando a acomodação do sistema. Esse mesmo comportamento foi observado por micropartículas obtidas utilizando-se *spray chilling* e GALM como material de parede, sem adição de quaisquer microrganismos ou ativo (Queirós et. al., 2020). Supostamente, a formação morfológica de um sistema menos ordenado pode favorecer a permanência do composto ativo dentro da matriz lipídica, visto que agrupamentos que exibiram partículas lipídicas com imperfeições, ou seja, heterogêneas e que se ordenavam de diferentes formas, acabavam acomodando mais facilmente o composto ativo no interior das partículas e no emaranhado entre as cadeias (MÜLLER et al., 2002)

Essa predisposição a aglomeração e heterogeneidade de tamanho das partículas observada através da microscopia eletrônica de varredura também foram observadas quanto a avaliação do tamanho das micropartículas, conforme pode ser observado na Figura 6. De uma maneira geral, as micropartículas apresentaram tamanho variando de 47 - 265  $\mu\text{m}$ . ( $D_{0,1}$  e  $D_{0,9}$ , respectivamente) e um diâmetro médio de 173  $\mu\text{m}$  ( $D_{4,3}$ ), sua distribuição foi monomodal com um índice de polidispersidade (*Span*) de 2,67. Apesar

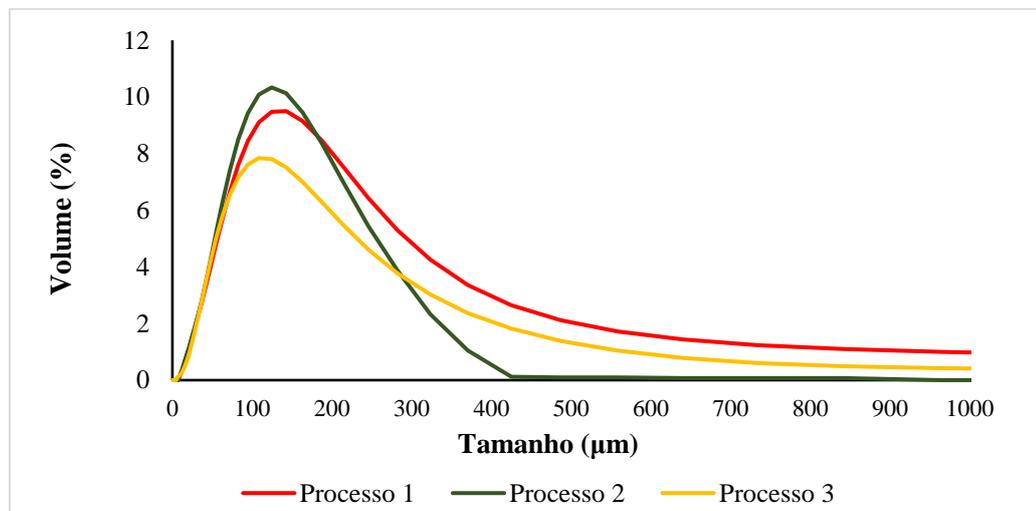
desse perfil de distribuição ter sido o mesmo observado por Queirós et al. (2020) e De Paiva et al. (2022) que utilizaram o mesmo material de parede (GALTH) na produção das micropartículas, no presente trabalho tivemos um aumento no tamanho do diâmetro médio e índice de polidispersidade encontrados. Essa diferença deve-se, possivelmente, pelas diferenças de composição do sistema da micropartícula como um todo, principalmente pelas diferenças do composto ativo e ausência da lecitina de soja agindo como tensoativo no preparo da emulsão.

O diâmetro médio das micropartículas produzidas pelo método *spray chilling* é reportado dentro de um intervalo relativamente amplo na literatura, entre alguns micrômetros até centenas deles ( $\mu\text{m}$ ). Jeyakumari et al. (2016) e Albertini et al. (2008) consideram que o tamanho médio que pode variar de 20-200  $\mu\text{m}$  e entre 50 e 600  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Já McClements (2020) relatou que o tamanho pode variar entre 3 e 800 $\mu\text{m}$  para micropartículas lipídicas, enquanto Pedroso et al. (2013) e Bampi et al. (2016) reportaram diâmetros médios menores que 100 $\mu\text{m}$  em micropartículas com diferentes tipos de bactérias probióticas como material ativo. De fato, considerando que o diâmetro das partículas é influenciado pelo tipo de bico atomizador, pela pressão de atomização, taxa de alimentação, natureza e proporção do composto ativo e da matriz e a viscosidade do líquido fundido a ser atomizado, variações em uma ampla faixa de tamanho, como as relatadas na literatura, são esperadas.

Segundo Chandramouli et al. (2004), partícula maiores (200 a 1000  $\mu\text{m}$ ) são mais eficazes para conferir proteção às micropartículas com compostos ativos Além disso, de acordo com Mortazavian et al. (2008), numa micropartícula maior consegue-se carregar um número maior de células das bactérias e, dessa maneira, aumentar a viabilidade da mesma num período mais longo. No entanto, micropartículas maiores podem causar uma sensação de boca de textura grosseira e arenosa. Hansen et al. (2002) sugerem um tamanho médio de cerca de até 100  $\mu\text{m}$  como desejável para aplicação direta em diversos tipos de alimentos, ou seja, medidas menores das encontradas neste trabalho.



**Figura 5:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das micropartículas lipídicas produzidas com gordura anidra do leite modificada (GALM) contendo *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* estabilizadas a 5 °C por 24 horas, com aumento de 200; 400 e 1000x nas três repetições de processo.

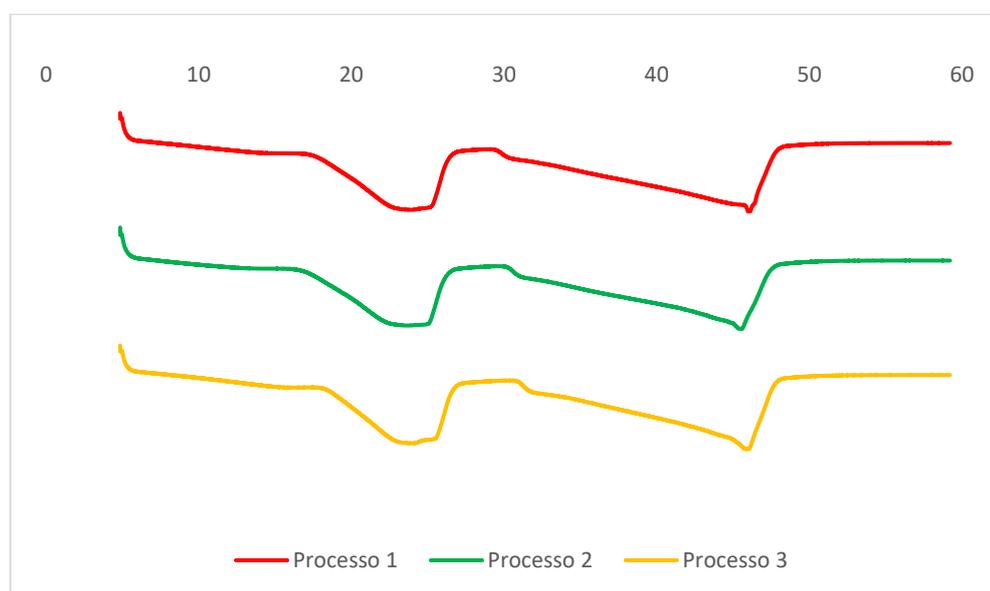


**Figura 6:** Diâmetro médio e distribuição de tamanho das micropartículas lipídicas estabilizadas a 5°C/24h.

A Figura 7 apresenta os termogramas e a Tabela 1 os parâmetros de fusão das micropartículas lipídicas contendo *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* estabilizadas a 5 °C por 24 horas. Observa-se que os três processos resultaram em micropartículas com comportamento térmico de fusão semelhantes, caracterizado por dois picos. A fusão segmentada observada na Figura 7 deve-se a complexidade da GALM utilizada como material de parede, cuja fusão é caracterizada

por apresentar picos largos e com eventos térmicos segmentados, conforme anteriormente demonstrado por Queirós et al., 2020. Observa-se que a temperatura de início de fusão foi equivalente à temperatura de estabilização das micropartículas (5°C). A temperatura final de fusão foi 59 °C e o pico máximo de fusão próximo de 46 °C, que corresponde ao ponto de fusão da GALM, que é o material lipídico de concentração majoritária das micropartículas avaliadas.

Quando avaliamos os dois picos separadamente, percebemos no primeiro (20 °C – 30 °C) que em todos os processos a temperatura final de fusão foi próxima de 27°C e o pico máximo de fusão foi atingido próximo a 24°C, o que corresponde aos triacilgliceróis (TAGs) compostos pelos ácidos graxos de cadeia curta e média. Já o segundo evento (30 °C – 50 °C) apresentou temperatura final de fusão a 49°C e a temperatura máxima de fusão registrada foi de 46°C sendo referente aos TAGs de ácidos graxos saturados de cadeia longa (WRIGHT et al, 2011). Resultados semelhantes foram encontrados em De Paiva et al. (2022) e Queirós et al. (2020), nos quais micropartículas produzidas por *spray chilling* utilizando GALM como material de parede apresentaram um comportamento térmico específico deste lipídio modificado, independente da adição ou não de um composto ativo (bactéria láctica) no sistema.



**Figura 7:** Termogramas das micropartículas lipídicas contendo *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* estabilizadas a 5 °C por 24 horas para os três processos.

**Tabela 1.** Parâmetros de fusão das micropartículas lipídicas contendo *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* estabilizadas a 5 °C por 24 horas nas três repetições de processos.

		Temperatura (°C)			
		Inicial	Final	Máxima	Entalpia (J/g)
<b>Processo 1</b>	<b>Geral</b>	4,88	59,22	46,06	149,20
	<b>1º Pico</b>	18,01	27,45	23,96	25,19
	<b>2º Pico</b>	29,42	48,96	46,06	46,24
<b>Processo 2</b>	<b>Geral</b>	4,88	59,16	45,55	146,70
	<b>1º Pico</b>	17,54	27,40	23,68	26,14
	<b>2º Pico</b>	30,18	49,14	45,55	44,45
<b>Processo 3</b>	<b>Geral</b>	4,88	59,21	45,99	143,60
	<b>1º Pico</b>	17,70	27,71	24,09	24,30
	<b>2º Pico</b>	30,26	49,52	45,99	45,59

Em resumo, as micropartículas apresentaram diâmetro médio de 173µm, morfologia esférica, lisa, heterogênea e com tendência a aglomeração, fundiram com comportamentos térmicos típicos da GALM e apresentaram uma média de alta contagem de bactérias lácticas totais (10,81 ciclos logarítmicos).

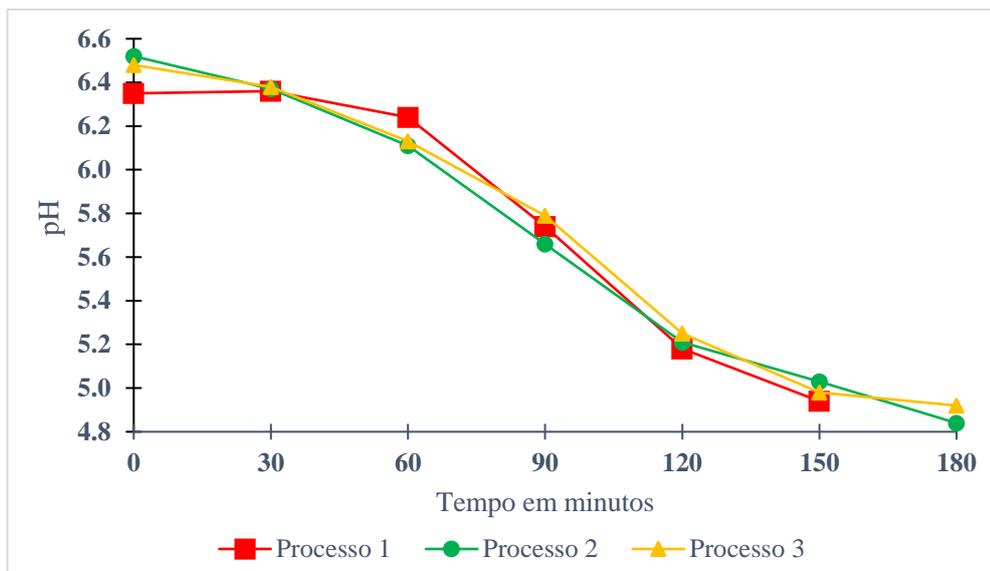
#### 4.2. Produção do iogurte batido tradicional base

A Tabela 2 e as Figura 8 e 9 apresentam o comportamento de acidificação do leite (pH e % de ácido láctico) durante a fabricação do iogurte batido tradicional base, que foi posteriormente dividido em porções e tratado termicamente para a produção dos iogurtes dos demais tratamentos.

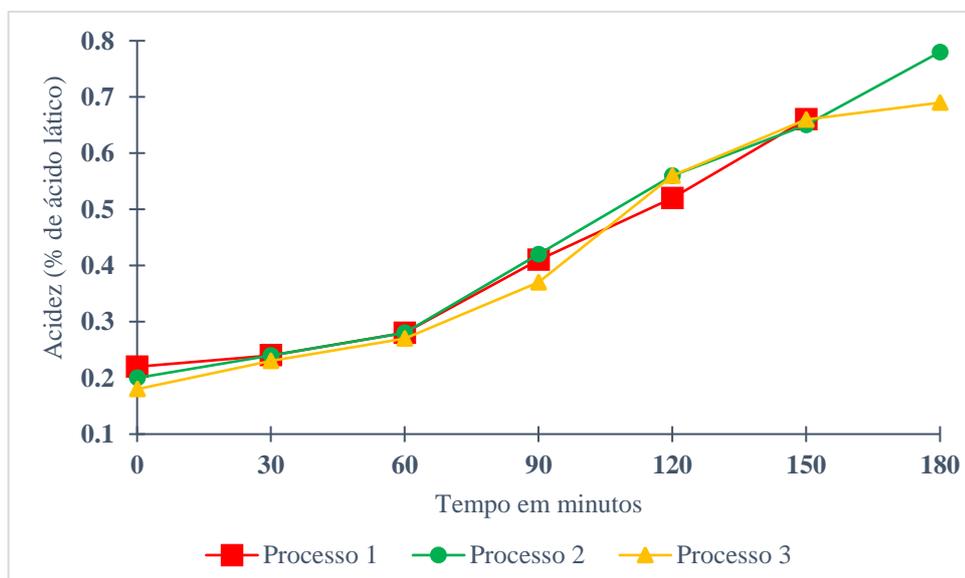
**Tabela 2.** Comportamento de fermentação do leite para obtenção dos iogurtes tradicionais base.

Comportamento de fermentação do leite						
Tempo (minutos)	Processo 1		Processo 2		Processo 3	
	pH	% Ácido láctico	pH	% Ácido láctico	pH	% Ácido láctico
<b>0*</b>	6,35	0,22	6,52	0,20	6,48	0,18
<b>30</b>	6,36	0,24	6,37	0,24	6,38	0,23
<b>60</b>	6,24	0,28	6,11	0,28	6,13	0,27
<b>90</b>	5,74	0,41	5,66	0,42	5,79	0,37
<b>120</b>	5,18	0,52	5,21	0,56	5,25	0,56
<b>150</b>	4,94	0,66	5,03	0,65	4,98	0,66
<b>180</b>	-	-	4,84	0,78	4,92	0,69

\* Imediatamente após a adição de cultura láctica



**Figura 8:** Comportamento do pH durante a fermentação dos iogurtes.



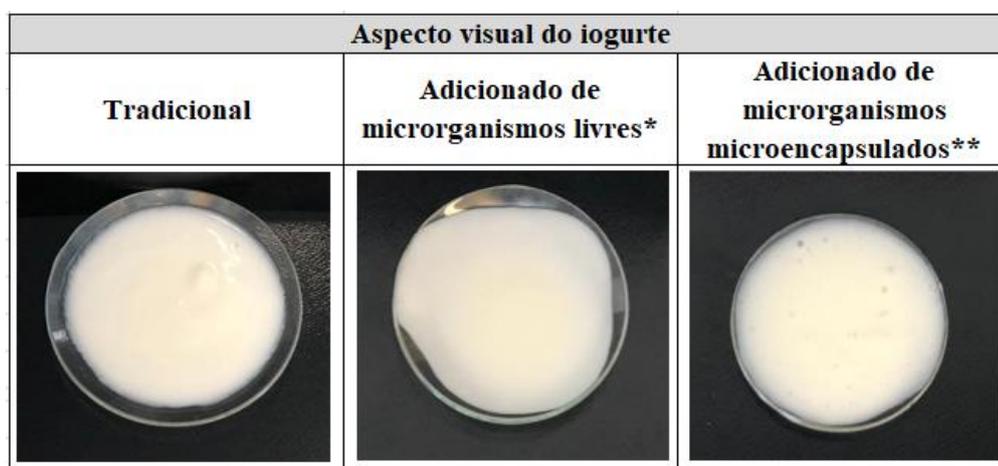
**Figura 9:** Comportamento da acidez durante a fermentação dos iogurtes.

Observa-se na Tabela 2 e nas Figuras 8 e 9 que o tempo médio de fermentação necessário para que o pH atingisse  $4,9 \pm 0,05$  foi de  $170 \pm 17$  min, ou 2,8 horas, o que é compatível com o tempo de fermentação do leite obtidos por culturas lácticas ativas de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (Walstra; Wouters; Geurts, 2006). O foi menor observado no Processo 1 (150 min) quando comparado aos demais processos (180 min.), deve-se, possivelmente, ao menor pH (0,15 unidades de pH) e maior acidez (0,03 % de ácido láctico) do que

o leite utilizado nos demais processos, embora eles fossem do mesmo lote de leite UHT.

#### 4.3. Produção e caracterização dos iogurtes tratados termicamente adicionado de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* livres e encapsulados utilizando GALM como material de parede

O iogurte batido tradicional e os iogurtes batidos tratados termicamente adicionados de microrganismos livres ou encapsulados apresentaram aspecto característico de iogurte natural, com a aparência de um gel viscoso e espesso, homogêneo, coloração branca, sem a presença de grumos ou sinérese aparente, como apresentado na Figura 10.



**Figura 10:** Aspecto visual dos iogurtes no tempo 0 de armazenamento. \**Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. \*\**Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* encapsulados por *spray chilling* utilizando gordura anidra do leite modificada (GALM) como matéria de parede.

O tratamento térmico utilizado (82°C/2 min.) foi capaz de reduzir em média 6,12 ciclos logarítmicos da concentração inicial das bactérias ácido lácticas. A média de contagem inicial dos três processos do iogurte batido tradicional estabilizado a 5°C/24h foi de  $10,06 \pm 0,11$  e  $3,94 \pm 0,05$  antes e após do tratamento térmico, respectivamente. Observa-se na Tabela 4 que a adição de microrganismos livres ou encapsulados após o TT resultou em iogurtes com contagens médias de bactérias ácido lácticas de 8,77 e 8,83 log UFC/g, respectivamente. Quando se compara a contagem bactérias ácido lácticas dos *pellets* e do iogurte resultante após a adição dos microrganismos livres ou encapsulados observa-se uma redução de 2,64 ciclos logarítmicos quando os microrganismos foram

incorporados na forma livre e de 1,98 ciclos logarítmicos quando estes foram incorporados após a encapsulação em GALM como material de parede. Em ambos os casos essa redução se deve à diluição do *pellet* ao serem inserido nos iogurtes. Ademais, no caso dos microrganismos inseridos em sua forma livre (*pellet*), além da diluição, a cultura mista sofreu com os fatores de estresses aos quais foram expostas, sendo esses uma combinação de estresse osmótico, maiores concentrações de ácido láctico, carência de carboidratos (quando comparado ao caldo MRS onde foram cultivadas) e refrigeração durante a estocagem (PAPADIMITRIOU et al., 2016).

**Tabela 3.** Efeito das etapas do processamento dos iogurtes sobre a viabilidade das bactérias ácido-láticas totais.

		<b>Processo 1</b>	<b>Processo 2</b>	<b>Processo 3</b>	
	<b>Etapas</b>	<b>(log UFC/g)</b>	<b>(log UFC/g)</b>	<b>(log UFC/g)</b>	<b>Média</b>
Iogurte tratado termicamente	<i>Pellet</i> (37°C/8h)	11,62 ± 0,18	11,42 ± 0,12	11,18 ± 0,10	11,41 ± 0,22
+ microrganismo livre	Iogurte + <i>pellet</i> (5°C/24h)	8,67 ± 0,05	8,84 ± 0,03	8,79 ± 0,07	8,77 ± 0,09
Iogurte tratado termicamente	Micropartícula (5°C/24h)	10,79 ± 0,15	10,83 ± 0,05	10,82 ± 0,25	10,81 ± 0,02
+ microrganismo microencapsulado	Iogurte + micropartícula (5°C/24h)	8,70 ± 0,16	8,89 ± 0,02	8,92 ± 0,08	8,83 ± 0,12

Uma vez inseridas nesse novo ambiente, as bactérias ácido lácticas devem responder a esse conjunto de estresses na tentativa de se adaptar, sobreviver, crescer e metabolizar compostos. Entretanto, a resposta ao estresse induz mudanças em toda a célula, variando de danos ao DNA até a interrupção do metabolismo, composição da membrana e construção da parede celular e, essas situações hostis e a falta de energia de reserva podem levar ao colapso das mesmas (VAN DE GUCHTE et al., 2002; FUQUAY, MCSWEENEY, & FOX, 2011).

A Tabela 4 apresenta a composição físico-químico e a contagem total de bactérias ácido-láticas dos três iogurtes, cujo comportamento foi acompanhado ao longo do

tempo: iogurte tradicional e iogurtes tratados termicamente e adicionados de microrganismos livres ou encapsulado utilizando GALM como material de parede.

**Tabela 4.** Composição físico-química, contagem microbiológica, desvio padrão e valor de p dos iogurtes tradicional e adicionado de microrganismos livres ou encapsulado utilizando GALM como material de parede (n = 3).

Determinações analíticas	Composição físico-química e contagem de bactérias ácido lácticas do iogurte			p-valor
	Tradicional	Tratado termicamente e adicionado de microrganismos livres**	Tratado termicamente e adicionado de microrganismos microencapsulados***	
<b>Físico-químicas</b>				
pH	4,71 ± 0,07	4,70 ± 0,05	4,73 ± 0,08	0,8589
Acidez (% ácido láctico)	0,73 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,60 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,0168
Sólidos totais (%)	13,08 ± 0,21	13,15 ± 0,10	13,39 ± 0,13	0,1056
Proteína (%)	4,14 ± 0,04	4,05 ± 0,15	4,11 ± 0,11	0,6200
Gordura (%)	3,29 ± 0,06 <sup>a</sup>	3,37 ± 0,08 <sup>ab</sup>	3,50 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,0210
Cinzas (%)	0,87 ± 0,01	0,88 ± 0,01	0,88 ± 0,01	0,1517
Lactose (%) *	4,79 ± 0,15	4,85 ± 0,17	4,90 ± 0,12	0,6921
<b>Microbiológicas</b>				
Contagem total de bactérias ácido lácticas UFC/g	1,14 x 10 <sup>10</sup> <sup>a</sup>	5,93 x 10 <sup>8</sup> <sup>b</sup>	7,07 x 10 <sup>8</sup> <sup>b</sup>	<0,0001

\*Calculada por diferença.

\*\**Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*.

\*\*\**Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* encapsulados por *spray chilling* utilizando gordura anidra do leite modificada (GALM) como material de parede.

<sup>a, b</sup> médias com a mesma letra na linha não diferem significativamente entre si (p ≥ 0,05)

Observa-se na Tabela 4 que os iogurtes não apresentaram diferenças significativas em relação ao pH e os teores de sólidos totais, proteínas, cinzas a lactose. Entretanto, diferiram significativamente em relação aos teores de gordura e acidez (% de ácido láctico). O teor de gordura do iogurte TT e adicionado de microrganismos encapsulados (3,50 ± 0,06%) foi significativamente maior que o do iogurte tradicional (3,29 ± 0,06%) e não diferiu do iogurte TT e adicionado de microrganismos livres (3,37 ± 0,08%), o qual, por sua vez, não diferiu do iogurte tradicional. Esse fator representa as diferenças entre

os tratamentos, uma vez que após o tratamento térmico os iogurtes foram adicionados de 1% de *pellet* de microrganismos livres suspenso em GAL ou 1% de micropartículas lipídicas. A maior concentração de matéria gorda no iogurte tem potencial sensorial e tecnológico benéficos, uma vez que a gordura é um parâmetro importante na aceitação do consumidor de iogurte e contribui também com a viscosidade do produto de maneira positiva (CHANDAN et al, 2013).

No tocante à acidez, observa-se que o iogurte batido tradicional apresentou, desde o início, porcentagem de ácido láctico significativamente maior ( $0,73 \pm 0,05$ ) que os tratados termicamente e adicionados de microrganismos livres ( $0,62 \pm 0,04$ ) e microrganismos microencapsulados ( $0,60 \pm 0,04$ ), os quais não diferiram entre si. Vale ressaltar que essa maior acidez inicial do iogurte tradicional pode corresponder ao fato do mesmo já estar com 72h de armazenamento refrigerado ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ) decorridas no ponto zero de análise, enquanto as outras duas amostras tratadas termicamente, foram estabilizadas apenas por 24h a  $5^\circ\text{C}$  depois de finalizadas. Essa diferença de tempo entre os tratamentos se deve a necessidade de outras etapas de processamento envolvidas nos iogurtes que foram tratados termicamente e adicionados de microrganismos, já que o iogurte tradicional foi utilizado como iogurte base na fabricação dos mesmos.

Além disso, o fato da porcentagem de ácido láctico se apresentar menor no tempo zero para os iogurtes tratados termicamente, pode ser atribuído à diluição do ácido láctico presente inicialmente no iogurte batido tradicional devido à adição direta de 0,5% de carboximetilcelulose durante o tratado termicamente, bem como a posterior adição de 1% de *pellet* de cultura láctea suspensos em gordura anidra do leite ou 1% de cultura láctea microencapsulada em gordura anidra do leite modificada. Ademais, embora as culturas lácteas homofermentativas produzam majoritariamente ácido láctico, compostos secundários, como ácidos acético e o butírico, também são produzidos durante a fermentação (TAMIME & ROBINSON, 1999). A presença de diferentes ácidos voláteis no iogurte, incluindo ácido butírico ácidos acético, em diferentes concentrações, têm sido reportada por diversos autores (ALONSO & FRAGA, 2001; GÖKTEPE & AKIN, 2020; CELIK & TEMIS, 2020) e durante o tratamento térmico ( $82^\circ\text{C}/2\text{min}$ ) a que foram submetidos os iogurtes é possível ocorrer a volatilização dos ácidos secundários presentes no iogurte (CHENG, 2010), o que também corrobora para menor acidez observada nesses produtos, quando comparados ao iogurte tradicional.

Independentes das diferenças apresentadas, todos os iogurtes atenderam aos padrões estabelecidos pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites

Fermentados da Instrução Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007 (BRASIL, 2007). Os produtos apresentaram teor de matéria gorda láctea entre 3,0 e 5,9%, se enquadrando na classificação de iogurtes integrais, proteínas lácteas acima do mínimo de 2,9% e acidez entre 0,6 e 1,5% ácido láctico.

Observa-se na Tabela 4 que o iogurte tradicional apresentou contagem de bactérias lácticas totais significativamente maior ( $1,14 \times 10^{10}$  UFC/g de iogurte) do que os iogurtes TT adicionados de microrganismo livres ( $5,93 \times 10^8$  UFC/g de iogurte) ou encapsulado ( $7,07 \times 10^8$  UFC/g de iogurte), os quais não diferiram entre si. Embora dois ciclos logarítmicos menores, os iogurtes TT e adicionados de microrganismo livres ou encapsulados, assim como o iogurte tradicional apresentam contagem de bactérias lácticas totais acima do limite estabelecido como padrão de identidade e qualidade de iogurtes, que é de  $10^7$  UFC/g (BRASIL, 2007). Uma vez dentro dos limites da legislação, uma menor concentração de bactérias ácido lácticas viáveis pode ser tecnologicamente mais interessante para a vida de prateleira do produto, pois pode reduzir a velocidade de pós-acidificação do produto (CHANDAN et al., 2013; MOZZI et al., 2016), o que é um fator limitante para sua qualidade, quer seja pelo atendimento à legislação, quer seja pela manutenção da sua qualidade sensorial. O aumento da acidez favorece a contração do gel, e o conseqüente aumento da liberação de soro (sinérese), que afeta a textura e a aparência visual do produto, além de favorecer a morte das bactérias ácido lácticas.

#### **4.4.Efeito dos tratamentos e do tempo de armazenamento refrigerado sobre pH, acidez e viabilidade das bactérias ácido lácticas dos iogurtes**

A Tabela 5 apresenta o resultado da análise estatística do efeito dos tratamentos, do tempo de armazenamento, bem como da interação desses fatores sobre o pH e acidez dos iogurtes. Observa-se que os tratamentos, do tempo de armazenamento, bem como a interação desses fatores afetaram significativamente o pH e acidez durante o armazenamento refrigerado.

**Tabela 5.** Efeito dos tratamentos, do tempo de armazenamento e da interação desses fatores sobre pH e acidez dos iogurtes (ANOVA) (n = 3).

Fator de variação	GL	p-valor	
		pH	acidez
Tratamentos*	2	<0,0001	<0,0001
Tempo**	8	<0,0001	<0,0001
Tratamento x tempo	16	<0,0001	<0,0001

\*Iogurte tradicional, iogurte tratado termicamente adicionado de microrganismos livres ou microencapsulado usando gordura anidra do leite modificada (GALM) como material de parede.

\*\* Tempo de armazenamento refrigerado (90 dias)

A Tabela 6 apresenta o pH e da acidez do iogurte tradicional e dos iogurtes tratado termicamente adicionado de microrganismos livres ou microencapsulado, durante 90 dias de armazenamento refrigerado. Observa-se que o iogurte tradicional apresentou, em média, menor pH ( $4,00 \pm 0,95$ ) do que os dos iogurtes tratado termicamente, sejam o adicionado de microrganismos livres ( $4,50 \pm 0,30$ ) ou encapsulados ( $4,51 \pm 0,27$ ), em ambos o pH não diferiram significativamente entre si (Tabela 6). Este mesmo comportamento foi observado em relação à acidez, que foi de  $1,56 \pm 1,16$ ;  $0,82 \pm 0,25$  e  $0,78 \pm 0,24$  para os iogurtes tradicionais e iogurtes tratado termicamente adicionado de microrganismos livres ou encapsulados, respectivamente. O iogurte tradicional apresentou maior acidez, sendo que os demais não diferiram entre si em relação a este parâmetro. Independente dos tratamentos, durante o armazenamento observou-se o aumento significativo da acidez e a redução do pH. No entanto, a pós-acidificação dos iogurtes, ou seja, o aumento da acidez e redução de pH, foi afetada pela interação entre os fatores tratamento e tempo de armazenamento (Tabela 5), como pode-se observar na Figura 11

**Tabela 6.** Valores pH, acidez ( $\pm$  desvio padrão) do iogurte tradicional e dos iogurtes tratado termicamente adicionado de microrganismos livres ou encapsulados durante 90 dias de armazenamento a 4°C (n=3).

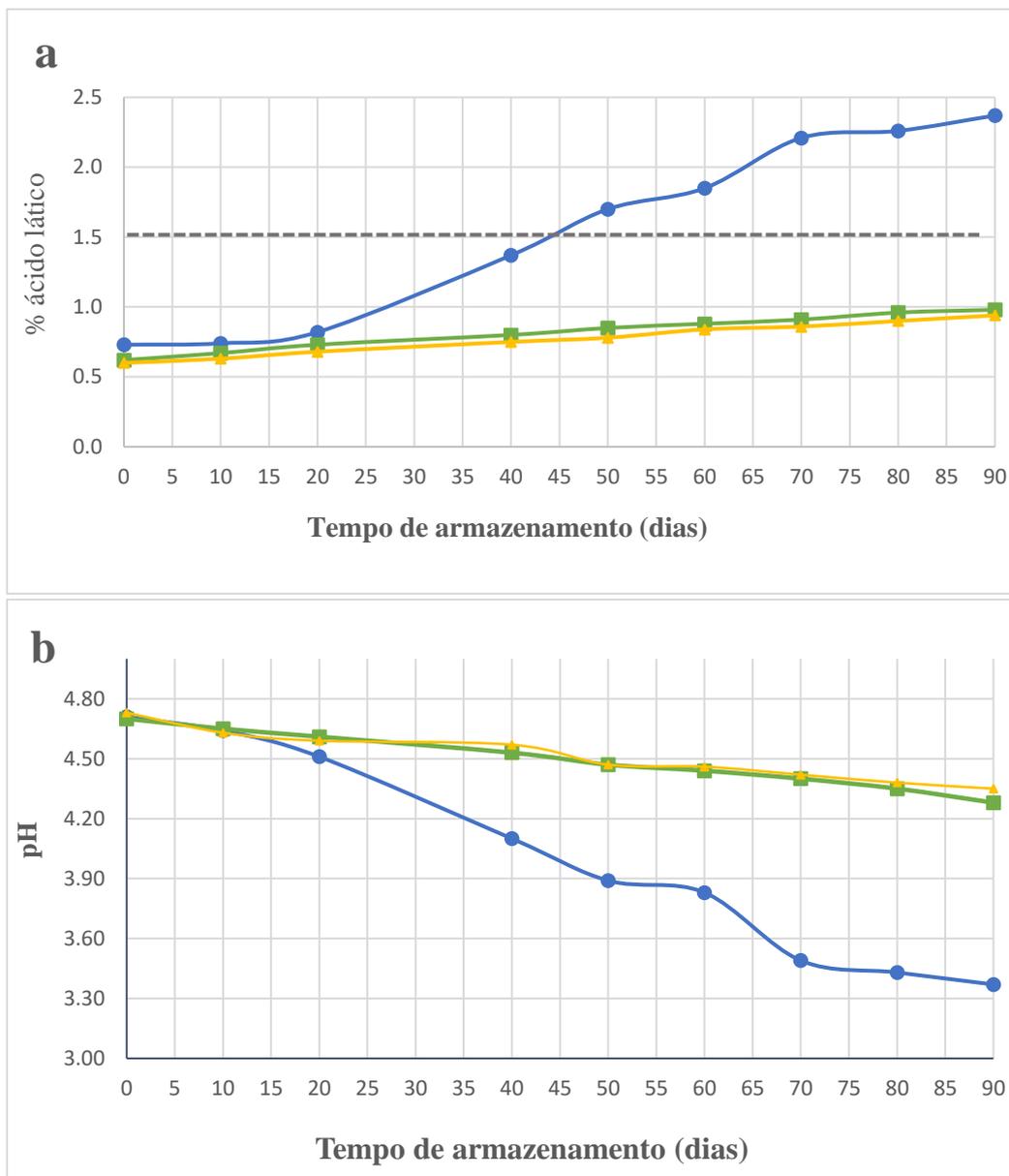
<b>pH dos Iogurtes</b>			
<b>Tempo de armazenamento (dias)</b>	<b>Tradicional</b>	<b>Tratado termicamente adicionado de microrganismos livres</b>	<b>Tratado termicamente adicionado de microrganismos encapsulados</b>
<b>0</b>	4,71 $\pm$ 0,07 <sup>aA</sup>	4,70 $\pm$ 0,05 <sup>aA</sup>	4,73 $\pm$ 0,08 <sup>aA</sup>
<b>10</b>	4,64 $\pm$ 0,05 <sup>aA</sup>	4,65 $\pm$ 0,05 <sup>abA</sup>	4,63 $\pm$ 0,04 <sup>abA</sup>
<b>20</b>	4,51 $\pm$ 0,05 <sup>aA</sup>	4,61 $\pm$ 0,05 <sup>abA</sup>	4,59 $\pm$ 0,04 <sup>bcA</sup>
<b>40</b>	4,10 $\pm$ 0,12 <sup>bB</sup>	4,53 $\pm$ 0,04 <sup>bcA</sup>	4,57 $\pm$ 0,03 <sup>bcdA</sup>
<b>50</b>	3,89 $\pm$ 0,12 <sup>bcB</sup>	4,47 $\pm$ 0,03 <sup>cdA</sup>	4,47 $\pm$ 0,05 <sup>cdeA</sup>
<b>60</b>	3,83 $\pm$ 0,12 <sup>cB</sup>	4,44 $\pm$ 0,02 <sup>cdeA</sup>	4,46 $\pm$ 0,05 <sup>deA</sup>
<b>70</b>	3,49 $\pm$ 0,08 <sup>dB</sup>	4,40 $\pm$ 0,04 <sup>deA</sup>	4,42 $\pm$ 0,05 <sup>eA</sup>
<b>80</b>	3,43 $\pm$ 0,09 <sup>dB</sup>	4,35 $\pm$ 0,03 <sup>efA</sup>	4,38 $\pm$ 0,04 <sup>eA</sup>
<b>90</b>	3,37 $\pm$ 0,10 <sup>dB</sup>	4,28 $\pm$ 0,06 <sup>fA</sup>	4,35 $\pm$ 0,03 <sup>eA</sup>

<b>Acidez (% de ácido láctico) dos Iogurtes</b>			
<b>Tempo de armazenamento (dias)</b>	<b>Tradicional</b>	<b>Tratado termicamente adicionado de microrganismos livres</b>	<b>Tratado termicamente adicionado de microrganismos encapsulados</b>
<b>0</b>	0,73 $\pm$ 0,05 <sup>dA</sup>	0,62 $\pm$ 0,04 <sup>fB</sup>	0,60 $\pm$ 0,04 <sup>dB</sup>
<b>10</b>	0,74 $\pm$ 0,04 <sup>dA</sup>	0,67 $\pm$ 0,03 <sup>efAB</sup>	0,63 $\pm$ 0,03 <sup>dB</sup>
<b>20</b>	0,82 $\pm$ 0,09 <sup>dA</sup>	0,73 $\pm$ 0,02 <sup>deA</sup>	0,68 $\pm$ 0,04 <sup>cdA</sup>
<b>40</b>	1,37 $\pm$ 0,07 <sup>cA</sup>	0,80 $\pm$ 0,02 <sup>cdB</sup>	0,75 $\pm$ 0,03 <sup>bcB</sup>
<b>50</b>	1,70 $\pm$ 0,11 <sup>bcA</sup>	0,85 $\pm$ 0,02 <sup>bcB</sup>	0,78 $\pm$ 0,04 <sup>bcB</sup>
<b>60</b>	1,85 $\pm$ 0,26 <sup>abcA</sup>	0,88 $\pm$ 0,03 <sup>bcB</sup>	0,84 $\pm$ 0,05 <sup>abB</sup>
<b>70</b>	2,21 $\pm$ 0,28 <sup>abA</sup>	0,91 $\pm$ 0,03 <sup>abB</sup>	0,86 $\pm$ 0,06 <sup>abB</sup>
<b>80</b>	2,26 $\pm$ 0,29 <sup>aA</sup>	0,96 $\pm$ 0,02 <sup>aB</sup>	0,90 $\pm$ 0,05 <sup>aB</sup>
<b>90</b>	2,37 $\pm$ 0,24 <sup>aA</sup>	0,98 $\pm$ 0,05 <sup>aB</sup>	0,94 $\pm$ 0,03 <sup>aB</sup>

<sup>A,B</sup> Letras maiúsculas diferentes nas linhas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey entre os tratamentos para o mesmo tempo de armazenamento ( $p < 0,05$ ).

<sup>a,b</sup> Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey entre os tratamentos ao longo do armazenamento refrigerado ( $p < 0,05$ ).



**Figura 11:** Efeito da interação entre os tratamentos e do tempo de armazenamento sobre a acidez (a) e o pH (b) dos iogurtes durante armazenamento a 4°C (n=3). Iogurte Tradicional (●), iogurte tratado termicamente adicionado de microrganismos livres (■) e iogurte tratado termicamente adicionado de microrganismos encapsulados (▲).

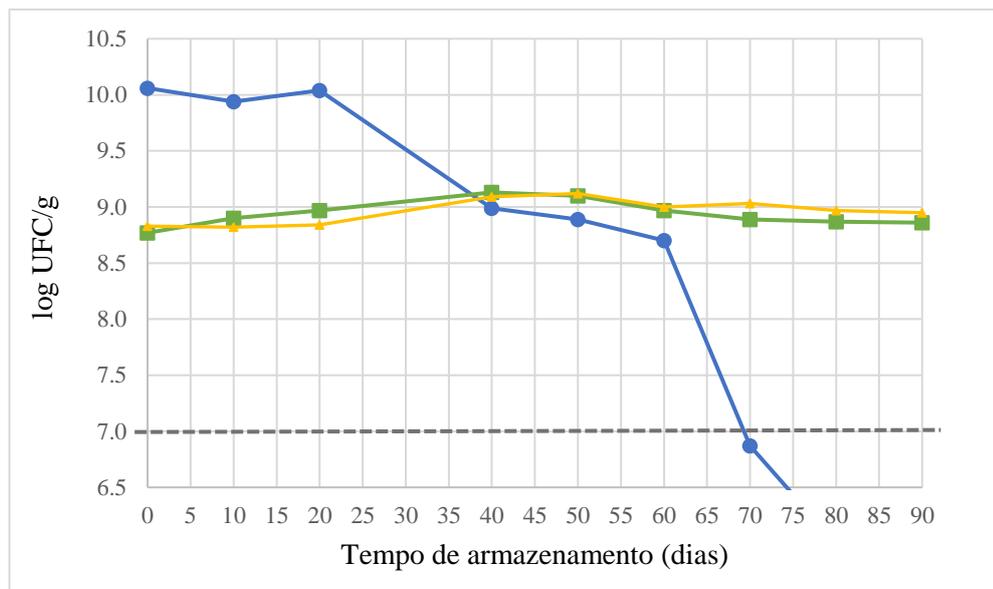
Após 45 dias de armazenamento refrigerado o iogurte tradicional atingiu 1,5% de ácido láctico, que é o valor máximo preconizado pela legislação para a manutenção da qualidade do produto (BRASIL, 2007). Após 50 dias, o produto já apresentava  $1,70 \pm 0,11\%$ , ou seja, 0,2% de ácido láctico acima do limite preconizado. A produção de ácido láctico foi acompanhada pelo decréscimo do pH, que entre 40 e 50 dias se apresentava entre  $4,10 \pm 0,12$  e  $3,89 \pm 0,12$ , e não diferiram significativamente entre si. Comportamento completamente distinto foi observado para os iogurtes tratados

termicamente adicionados de microrganismos livres ou encapsulados. Mesmo após 90 dias de armazenamento os produtos não apresentaram diferença significativa de pH e acidez, que foi de  $4,28 \pm 0,06$  e  $0,98 \pm 0,05$  % de ácido láctico para o iogurte adicionado de microrganismos livres e  $4,35 \pm 0,03$  e  $0,94 \pm 0,03$ % de ácido láctico para os adicionados de microrganismos encapsulados.

A Tabela 7 e a Figura 12 apresentam a viabilidade das bactérias ácido lácticas totais dos iogurtes durante 90 dias de armazenamento a 4°C.

**Tabela 7.** Viabilidade das bactérias ácido lácticas totais dos iogurtes durante armazenamento a 4°C. (n=3).

Tempo de armazenamento (dias)	Viabilidade (log UFC/ g) das bactérias ácido lácticas totais dos iogurtes		
	Tradicional	Tratado termicamente adicionado de microrganismos livres	Tratado termicamente adicionado de microrganismos encapsulados
0	$10,06 \pm 0,11$	$8,77 \pm 0,09$	$8,83 \pm 0,12$
10	$9,94 \pm 0,14$	$8,90 \pm 0,08$	$8,82 \pm 0,27$
20	$10,04 \pm 0,20$	$8,97 \pm 0,14$	$8,84 \pm 0,26$
40	$8,99 \pm 0,05$	$9,13 \pm 0,16$	$9,09 \pm 0,08$
50	$8,89 \pm 0,06$	$9,10 \pm 0,01$	$9,12 \pm 0,06$
60	$8,70 \pm 0,25$	$8,97 \pm 0,14$	$9,00 \pm 0,09$
70	$6,87 \pm 0,11$	$8,89 \pm 0,04$	$9,03 \pm 0,11$
80	< 6,00	$8,87 \pm 0,17$	$8,97 \pm 0,09$
90	< 6,00	$8,86 \pm 0,08$	$8,95 \pm 0,09$



**Figura 12:** Viabilidade das bactérias ácido lácticas totais durante a estocagem a 4°C. Iogurte Tradicional (●) iogurte tratado termicamente adicionado de microrganismos livres (■) e iogurte tratado termicamente adicionado de microrganismos encapsulados (▲)

Observa-se na Tabela 7 e na Figura 12 que o armazenamento refrigerado afetou de forma distinta a viabilidade das bactérias ácido lácticas do iogurte tradicional, tratado termicamente adicionado de microrganismos livres ou encapsulados. Independente da forma de adição dos microrganismos, os iogurtes tratados termicamente mantiveram altas contagens de bactérias lácticas durante 90 dias de armazenamento refrigerado, enquanto o iogurte tradicional apresentou uma queda constante na viabilidade de bactérias lácticas, a qual foi acentuada e abrupta após 60 dias de armazenamento. O desenvolvimento mais acelerado da pós-acidificação (Tabela 6 e Figura 11) quando se compara os iogurtes que possuem *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* livres (tradicional e tratado termicamente adicionado de microrganismo livres) pode estar relacionado aos fatores intrínsecos aos sistemas. Dentre esses fatores pode-se citar a ausência de estabilizante/espessante carboximetilcelulose (0,5%) e a mais alta concentração inicial de bactérias ácido lácticas viáveis no iogurte tradicional. A ausência do estabilizante resulta em maior quantidade de água livre disponível para o metabolismo bacteriano (DICKINSON, 2018), enquanto a maior concentração de bactérias ácido lácticas viáveis ( $10,06 \pm 0,11$  no iogurte tradicional contra  $8,77 \pm 0,12$  no iogurte tratado termicamente e adicionado de microrganismos livres) contribui com uma pós-acidificação mais acelerada devido ao metabolismo bacteriano (MOZZI et al., 2013).

Após 70 dias de armazenamento o iogurte tradicional apresentou contagens de 6,87 log UFC/g, o que representa uma queda de 3,19 ciclos logarítmicos durante este período, enquanto os iogurtes tratados termicamente apresentaram contagens de 8,89 e

9,03 logs UFC/g quando os microrganismos foram adicionados na forma livre ou encapsulada, respectivamente. Com estes comportamentos, após 70 dias de armazenamento o iogurte tradicional apresentou contagem abaixo do limite estabelecido pela legislação (BRASIL, 2007), que é de no mínimo 7,00 logs UFC/g de produto. Além disso, observou-se visualmente a presença de bolores e leveduras no iogurte tradicional, o que não foi observado para os iogurtes tratados termicamente durante todo o período de estocagem. Vale destacar que após 70 dias de armazenamento refrigerado o iogurte tradicional apresentava um aumento significativo de 1,48 % de ácido láctico e a redução de 1,22 unidades de pH, enquanto que para os iogurtes tratados termicamente o aumento na porcentagem de ácido láctico foi de 0,3% com redução de 0,3 unidades de pH. Desta forma, o aparecimento de bolores e leveduras no iogurte tradicional pode estar associado às condições intrínsecas das amostras neste período de estocagem, ou seja, declínio da contagem de bactérias ácido lácticas, isto é, inexistência de competição microbiana e a alta acidez, visto que diversos tipos de leveduras possuem atividades tolerantes a concentrações maiores de ácidos como as do gênero *Candida* e *Saccharomyces* spp. (MOUBASHER et al., 2018; ROBINSON, 2005).

Após 90 dias de armazenamento refrigerado, os iogurtes tratados termicamente adicionado de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* livres ou encapsulados utilizando GALM como material de parede apresentaram contagem de  $8,86 \pm 0,08$  e  $8,95 \pm 0,09$  log UFC/g de produto, respectivamente, ou seja, 1,86 e 1,95 ciclos logarítmicos acima do mínimo exigido pela legislação (BRASIL, 2007), respectivamente. Observa-se que em ambos os casos os microrganismos não só mantiveram a viabilidade, como também mantiveram sua capacidade de multiplicação, uma vez que após 40 e 50 dias de armazenamento observou-se um aumento médio de aproximadamente 0,3 log UFC/g de produto na contagem de bactérias lácticas totais

Esses resultados sugerem que os iogurtes em questão poderiam continuar estocados sem grandes prejuízos a concentração de bactérias ácido lácticas por um período relativamente estendido, sem que o limitante da legislação fosse atingido para este parâmetro.

Assim sendo, a acidez foi o primeiro atributo a ser desatendido, visto que neste período de armazenamento a contagem de bactérias ácido lácticas ainda se encontrava com média de  $8,89 \pm 0,06$  log UFC/g de produto, ou seja, dentro dos padrões exigidos (mínimo  $10^7$  UFC/g).

Ao final dos 90 dias de estocagem refrigerada, ambos os tratamentos ainda se encontravam com uma acidez ligeiramente distante do limite legal e, como o iogurte adicionado de micropartículas teve um aumento de apenas 0,34% de ácido láctico durante todo o período, bem como o iogurte com *pellet* teve somente 0,36% de acréscimo, supõe-se que os mesmos ainda poderiam ser armazenados por mais um período relativamente prolongado de tempo, sem que o limitante de acidez fosse ultrapassado. Vale ressaltar que o mesmo é sugerido pelos resultados de contagem de bactérias ácido lácticas que ainda poderiam ser atendidos também.

Diante dos resultados encontrados, verifica-se que a reintegração dos microrganismos após o tratamento térmico do iogurte tradicional, seja na forma livre ou encapsulada, alcançou um prazo de validade mais estendido que o de outras metodologias presentes na literatura. Al-Rimawi et al. (2020) adicionou óleos essenciais de canela e eucalipto e conseguiu aumentar a vida útil do Labneh em até 6 semanas a  $5 \pm 1$  °C.

Já Shahbazi & Shavisi (2019) avaliaram o efeito da adição do extrato de orégano no iogurte, durante o armazenamento refrigerado (4°C) por 30 dias e verificaram que o iogurte com adição de 1,5% de extrato de orégano manteve o pH inicial constante e apresentou aumento de apenas 0,07% na quantidade de ácido láctico ao final da estocagem. Os valores diferem dos encontrados neste trabalho, já que com 20 dias de armazenamento, o iogurte adicionado de *pellet* de microrganismos livres e iogurte o adicionado de micropartículas lipídicas já haviam apresentado aumento de 0,11 e 0,08% na acidez, respectivamente. Bem como o pH já havia sofrido um decréscimo de 0,09 e 0,14, também respectivamente. Entretanto, o estudo não relata se a adição do extrato de orégano declinou a viabilidade da cultura mista de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, o que deve ser avaliado impreterivelmente para que o produto possa ser designado ou não como iogurte, perante a legislação vigente.

Dubrovskii et al. (2019) incluíram extrato de semente de erva-doce em pó no leite antes da fermentação para verificar a influência das atividades bioativas desse composto (antibacteriana, antifúngica e antioxidante) no prazo de validade do iogurte. Os resultados da incorporação de 1% de extrato sugeriram um aumento na vida útil do iogurte de 10 para 15 dias, a uma temperatura de armazenamento de  $4 \pm 2$  °C. Vale ressaltar que ao final desse tempo de armazenamento, o iogurte adicionado de extrato ainda apresentava todos os parâmetros dentro da legalidade, entretanto, durante a fermentação do mesmo, os dados apresentados mostraram que com a adição do extrato ao leite, o ácido láctico acumulado ao final da fermentação estava em um nível superior ao do iogurte controle

(0,94% e 0,85%, respectivamente), o que em um período mais estendido de armazenamento não seria tecnologicamente interessante para a vida de prateleira do iogurte. Esses resultados são diferentes dos encontrados no presente estudo, já que as metodologias utilizadas para prolongar o prazo de validade diminuíram a acidez com que o produto iniciou a estocagem refrigerada, sendo este um aspecto atrativo, visto que é interessante que ponto inicial de concentração de ácido láctico para estocagem esteja mais distante do limite legal e, dessa maneira, consiga um armazenamento num período maior de tempo antes que o limitante seja atingido.

## 5.0. CONCLUSÃO

A gordura anidra do leite modificada (GALM) utilizada como material de parede demonstrou eficácia em inibir a atividade metabólica da cultura láctea mista das micropartículas adicionadas ao iogurte tratado termicamente e impedir sua interação com o meio adverso, visto que durante os 90 dias de armazenamento a 4 °C não houve aumento da contagem das bactérias lácteas totais destes produtos.

O tratamento térmico e posterior adição de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* livres ou microencapsulados mostraram-se igualmente eficientes no aumento da vida de prateleira do iogurte batido tradicional, visto que após 90 dias de estocagem refrigerada, os mesmos ainda se encontravam dentro de todos os parâmetros legais, diferentemente do iogurte batido tradicional, que chegou ao limitante de sua vida de prateleira no dia 50 de armazenamento, onde foi constatada uma acidez acima do limite preconizado pela legislação.

De forma geral, independente da metodologia de reintegração utilizada, quer seja pela posterior adição dos microrganismos livres ou posterior adição dos microrganismos microencapsulados, possibilitam uma alta contagem de bactérias lácticas totais e uma vida de prateleira prolongada ao produto, o que também simultaneamente viabiliza que o produto final seja denominado como iogurte em ambos, visto que os parâmetros legais de acidez e viabilidade de bactérias ácido lácticas foram atendidos.

## 6.0. REFERÊNCIAS

ABBAS, Shabbar et al. Ascorbic acid: microencapsulation techniques and trends—a review. **Food Reviews International**, v. 28, n. 4, p. 343-374, 2012.

ALBERTINI, B. et al. New spray congealing atomizer for the microencapsulation of highly concentrated solid and liquid substances. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 69, p. 348-357, 2008.

ALHEJAILI, M. et al. Influence of an aqueous myrrh suspension on yogurt culture bacteria over yogurt shelf life. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 3, p. 2011-2016, 2019.

AL-RIMAWI, Fuad et al. Use of cinnamon, wheat germ, and eucalyptus oils to improve quality and shelf life of concentrated yogurt (Labneh). **Cogent Food & Agriculture**, v. 6, n. 1, p. 1807810, 2020.

ALONSO, L.; FRAGA, M. J. Simple and rapid analysis for quantitation of the most important volatile flavor compounds in yogurt by headspace gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatographic science**, v. 39, n. 7, p. 297-300, 2001.

ANEJA, R.M., Mathur, B.N., Chandan, R.C., Banerjee, A.K.. Technology of Indian Milk Products. **Dairy India Publication**, New Delhi, India, p. 183–196.2002

AOAC INTERNATIONAL. **AOAC International Guidelines for Laboratories Performing Microbiological and Chemical Analyses of Food and Pharmaceuticals**. AOAC international, 2006.

AOCS, AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign: American Oil Society, 2009.

ARSLAN-TONTUL, Sultan; ERBAS, Mustafa. Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. **Lwt-food science and technology**, v. 81, p. 160-169, 2017.

BABER SOHAIL, Nuzhat Huma et al. Use of tukhm-e-balangu (*Lallemantia royleana*) as a Stabilizer in set type Yogurt. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**. V 20. N 3, 247–256, 2014.

BAMPI, Gabriel Bonetto et al. Spray chilling microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and its use in the preparation of savory probiotic cereal bars. **Food and bioprocess technology**, v. 9, n. 8, p. 1422-1428, 2016.

BONG, D. D.; MORARU, C. I. Use of micellar casein concentrate for Greek-style yogurt manufacturing: effects on processing and product properties. *Journal of Dairy Science*, v. 97, p. 1259–1269, 2014.

- BOTH, Emese; BODOR, Zsolt; ALBERT, Beata. Effect of microencapsulation on viability and survival in simulated gut conditions of probiotic bacteria. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 23, n. 6, p. 14140, 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria N° 370, 4 de setembro de 1997, que aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UHT (UAT). Diário Oficial da União: Brasília, 8 de setembro. 1997.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 46, de 23 de outubro de 2007, que ado a o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**: Brasília, seção 1, p. 524 de outubro. 2007.
- BRASIL. Portaria n° 146 de 07 de março de 1996. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Gordura Anidra de Leite (ou Butteroil)**. Anexo VIII - Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 1996.
- BRATOVCIC, AMRA; SULJAGIC, JASMIN. Micro-and nano-encapsulation in food industry. **Croatian journal of food science and technology**, v. 11, n. 1, p. 113-121, 2019.
- BROWNLIE, K. Marketing Perspective of Encapsulation Technologies in Food Applications. In: LAKKIS, J. M. (Ed.). **Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems**. 1. Ames: Blackwell Publishing, v.1, 2007. cap. 10, p.213-233.
- CASTRO, A. G. **A química e a reologia no processamento dos alimentos**. São Paulo, Instituto Piaget, 2002,
- CÉLIA, Juliana Aparecida et al. Influence of heat treatment on physicochemical and rheological characteristics of natural yogurts. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 2489-2503, 2017.
- CELIK, Omer & TEMIZ, Hasan. Traditional yogurt dilemma; rich flavor vs. microbial safety: An investigation on Volatile Aroma Profiles, Chemical, and Microbiological Qualities of Traditional Yogurts. **Journal of Central European Agriculture**, v. 21, n. 3, p. 461-475, 2020.
- CHANDAN, Ramesh C.; KILARA, Arun (Ed.). **Manufacturing yogurt and fermented milks**. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell, 2013.
- CHENG, Hefa. Volatile flavor compounds in yogurt: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 50, n. 10, p. 938-950, 2010.
- CONSOLI, Larissa et al. Gallic acid microparticles produced by spray chilling technique: Production and characterization. **LWT-Food Science and Technology**, v. 65, p. 79-87, 2016.
- COSTA, Marion P. et al. Effect of different fat replacers on the physicochemical and

- instrumental analysis of low-fat cupuassu goat milk yogurts. **Journal of Dairy Research**, v. 83, n. 4, p. 493-496, 2016.
- DA SILVA, Neusely et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. Editora Blucher, 2017
- DE PAIVA E SILVA, KÍVEA KÁSSIA; DE SOUZA QUEIRÓS, MAYARA ; RIBEIRO, ANA PAULA BADAN ; Gigante, Mirna Lúcia . Modified milk fat as encapsulating material for the probiotic microorganism *Lactobacillus acidophilus* LA3. **International Dairy Journal**, v. 125, p. 105237, 2022.
- DICKINSON, Eric. Hydrocolloids acting as emulsifying agents—How do they do it?. **Food Hydrocolloids**, v. 78, p. 2-14, 2018
- DONKOR, O. N. et al. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 10, p. 1181-1189, 2006.
- DU, Baiqiao et al. The stabilization mechanism of acidified milk drinks induced by carboxymethylcellulose. **Le Lait**, v. 87, n. 4-5, p. 287-300, 2007.
- DUBROVSKII, I. I. et al. Development of formulation and technology of yogurt with prolonged shelf life enriched with biologically active substances from fennel seed extract. Estonian University of Life Sciences. Vol. 17, Special Issue 2. **Agronomy Research**, p. 1313–1323, 2019.
- FOX, P. F.; T. UNIACKE-LOWE, MCSWEENEY, P. L. H.; O'MAHONY, J.A. **Dairy chemistry and biochemistry**. 2th. ed. Springer, 2015, p. 547.
- FUQUAY, John W.; MCSWEENEY, Paul LH; FOX, Patrick F. **Encyclopedia of dairy sciences**. Academic Press, 2011.
- GANI, Adil et al.  $\beta$ -d-glucan as an enteric delivery vehicle for probiotics. **International journal of biological macromolecules**, v. 106, p. 864-869, 2018.
- GAWAI, Kunal M.; MUDGAL, Sreeja P.; PRAJAPATI, Jashbhai B. Stabilizers, Colorants, and Exopolysaccharides in Yogurt. In: **Yogurt in Health and Disease Prevention**. Academic Press, 2017. p. 49-68.
- GÖKTEPE, Çiğdem Konak; AKIN, Nihat. Determination of aroma and volatile flavor compounds and sensory properties of set-type yoghurts enriched with immature wheat grain. **Ukrainian Journal of Food Science**, p. 22, 2020.
- GONZÁLEZ-FERRERO, C.; IRACHE, J. M.; GONZÁLEZ-NAVARRO, C. J. Soybean protein-based microparticles for oral delivery of probiotics with improved stability during storage and gut resistance. **Food chemistry**, v. 239, p. 879-888, 2018
- GOUIN, Sebastien. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in food science & technology**, v. 15, n. 7-8, p. 330-347, 2004.
- GULDAS, M.; ATAMER, M. Effect of pasteurization norm and storage temperature on

the quality of long life yoghurt. **Gida**, v. 20, n. 5, p. 313-319, 1995

HAN, Xue et al. Improvement of the texture of yogurt by use of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

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

HARTE, F.; LUEDECKE, L.; SWANSON, B.; BARBOSA-CANOVAS, G. V. Low-fat set yogurt made from milk subjected to combinations of high hydrostatic pressure and thermal processing. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1074, 2003.

HUPPERTZ, T. **Homogenization of milk: High-pressure homogenizers**. Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol. 10, NIZO Food Research, Ede, the Netherlands. p. 755-760. 2011

HUSSEIN, M.M., HASSAN, F.A.M., DAYM, H.A.A., SALAMA, A., ENAB, A.K., Abd El-Galil, A.A.. Utilization of some plant polysaccharides for improving yogurt consistency. **Annals of Agricultural Sciences**. 56 (2), 97–103. 2011.

JANHØJ, Thomas; FRØST, Michael Bom; IPSEN, Richard. Sensory and rheological characterization of acidified milk drinks. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 5, p. 798-806, 2008.

JEYAKUMARI, A.; ZYNUDHEEN, A. A.; PARVATHY, U. Microencapsulation of bioactive food ingredients and controlled release-A review. **MOJ Food Processing & Technology**. v 2(6). 2016.

JIZOMOTO, H.; KANAOKA, E.; SUGITA, K.; HIRANO, K. Gelatin-acacia microcapsules for trapping micro oil droplets containing lipophilic drugs and ready disintegration in the gastrointestinal tract. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 8, p. 1115-1122, 1993.

LEE, Sung Je; SHERBON, John W. Chemical changes in bovine milk fat globule membrane caused by heat treatment and homogenization of whole milk. **Journal of Dairy Research**, v. 69, n. 4, p. 555-567, 2002

LEE, W. J.; LUCEY, J. A. Structure and physical properties of yogurt gels: Effect of inoculation rate and incubation temperature. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 10, p. 3153-3164, 2004.

LI, Juan-Mei; NIE, Shao-Ping. The functional and nutritional aspects of hydrocolloids in foods. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 46-61, 2016

LOVEDAY, Simon M.; SARKAR, Anwasha; SINGH, Harjinder. Innovative yoghurts: Novel processing technologies for improving acid milk gel texture. **Trends in food science & technology**, v. 33, n. 1, p. 5-20, 2013.

LUCEY, John A. et al. Effect of heat treatment on the physical properties of milk gels

made with both rennet and acid. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7, p. 559-565, 2001.

MACGIBBON, A. K. H.; TAYLOR, M. W. Composition and structure of bovine milk lipids. In: **Advanced dairy chemistry volume 2 lipids**. Springer, Boston, MA, 2006. p. 1-42.

MADENE, Atmane et al. Flavour encapsulation and controlled release—a review. **International journal of food science & technology**, v. 41, n. 1, p. 1-21, 2006.

MARTÍN, María José et al. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 27, p. 15-25, 2015.

MATARAGAS, M. et al. Quantifying the spoilage and shelf-life of yoghurt with fruits. **Food Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 611-616, 2011.

MCCLEMENTS, David Julian. Advances in nanoparticle and microparticle delivery systems for increasing the dispersibility, stability, and bioactivity of phytochemicals. **Biotechnology advances**, v. 38, p. 107287, 2020.

MCKENNA, A. B. Effects of homogenization pressure and stabilizer concentration on the physical stability of longlife laban. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**, v. 22, n. 2, p. 167-174, 1987.

MEDEIROS, A. C.; SOUZA, D. F.; CORREIA, ROBERTA TP. Effect of incubation temperature, heat treatment and milk source on the yoghurt kinetic acidification. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 3, 2015.

MING; C. C.; GIOIELLI, L. A.; GRIMALDI, R. Lipídios estruturados obtidos a partir da mistura de gordura de frango, sua estearina e triacilgliceróis de cadeia média. I- Composição em ácidos graxos e em triacilgliceróis. **Química Nova**, v. 31, p. 232-237, 2008.

MORTAZAVIAN, A. M. et al. Survival of encapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) after the product exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Milchwissenschaft**, v. 63, n. 4, p. 427, 2008.

MOUBASHER, A.-AH; ABDEL-SATER, M. A.; SOLIMAN, Z. S. M. Yeasts and filamentous fungi associated with some dairy products in Egypt. **Journal de mycologie medicale**, v. 28, n. 1, p. 76-86, 2018

MOZZI, F. et al. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria—Novel Applications 2e**. 2016.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, SA12176234. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International journal of pharmaceutics**, v. 242, n. 1-2, p. 121-128, 2002.

NGUYEN, Phuong TM et al. Effect of different hydrocolloids on texture, rheology,

tribology and sensory perception of texture and mouthfeel of low-fat pot-set yoghurt. **Food Hydrocolloids**, v. 72, p. 90-104, 2017.

O'DONNELL, H. J.; BUTLER, F. Time-dependent viscosity of stirred yogurt. Part I: couette flow. **Journal of food engineering**, v. 51, n. 3, p. 249-254, 2002.

OKURO, P. K.; DE MATOS JÚNIOR, F. E; FAVARO-TRINDADE, C.S. Technological challenges for spray chilling encapsulation of functional food ingredients. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, n.2, p. 171-182, 2013.

OKURO, P.K.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J.C.; LIBERAL, R.D.; FAVAROTRINDADE, C. S. Co- encapsulation of Lactobacillus acidophilus with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. **Food research international**, v.53(1), p.96-103. 2013.

OKURO, Paula Kiyomi. **Desenvolvimento, avaliação e aplicação de micropartículas simbióticas produzidas por spray chilling**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo

PAPADIMITRIOU, Konstantinos et al. Stress physiology of lactic acid bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 837-890, 2016.

PEDROSO, D. L. et al. Microencapsulation of Bifidobacterium animalis subsp. lactis and Lactobacillus acidophilus in cocoa butter using spray chilling technology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 777-783, 2013.

PEDROSO, Daniela de Lara et al. Protection of Bifidobacterium lactis and Lactobacillus acidophilus by microencapsulation using spray-chilling. **International Dairy Journal**, v. 26, n. 2, p. 127-132, 2012.

PEGG, R.B.; SHAHIDI, F. Encapsulation, Stabilization, and Controlled Release of Food Ingredients and Bioactives. IN: Rahman, M.S. (Editor). **Handbook of Food Preservation**. CRC Press, 2007. Capítulo 22, p.509 – 568.

PELLISSARI, Julio Rafael. **Efeito da encapsulação de licopeno na sua estabilidade e biodisponibilidade**. 2014. 92 f. Dissertação de mestrado. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

QUEIRÓS, M. S. ; VIRIATO, R. L. S. ; RIBEIRO, A. P. B. ; GIGANTE, M. L. **Processo de obtenção de gordura anidra do leite totalmente hidrogenada, gordura anidra do leite totalmente hidrogenada assim obtida e uso da mesma**. Depositante: Universidade Estadual de Campinas. Número do registro: BR10201900042, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 09/01/2019.

QUEIRÓS, Mayara de Souza. **Gordura do leite modificada: produção, caracterização e avaliação do potencial tecnológico para estruturar bases lipídicas e compor sistemas micro e nanoparticulados**. 2018. 159p. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Camponas, Campinas.

QUEIRÓS, Mayara. S. et al. Dairy-based solid lipid microparticles: A novel approach. **Food Research International**, v. 131, p. 109009, 2020.

REMEUF, F.; MOHAMMED, S.; SODINI, I.; TISSIER, J.P. Preliminary observations on the effects of milk fortification and heating on microstructure and physical properties of stirred yogurt. **International Dairy Journal**, v. 13, p.773–782. 2003.

RIBEIRO A. P. B, BASSO R. C & KIECKBUSCH, T. G. Effect of the addition of hardfats on the physical properties of cocoa butter. *Eur J Lipid Sci Technol.*; v. 115, n. 3, p. 301-312, 2013.

RIBEIRO, A. P. B.; GONÇALVES; L. A. G.; GIOIELLI, L. A.; BASSO, R. C. Interesterification: Alternative for Obtaining Zero Trans Fat Bases for Food Applications. In: HAGHI, A. K. (Org.). **Advances in Food Science and Technology**. Nova York: Nova Science Publishers, 2010. p. 10-92.

ROBINSON, Richard K. (Ed.). **Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products**. John Wiley & Sons, 2005.

SAHA, Dipjyoti; BHATTACHARYA, Suwendu. Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review. **Journal of food science and technology**, v. 47, n. 6, p. 587-597, 2010

SAMEDI, Lesly; CHARLES, Albert Linton. Viability of 4 probiotic bacteria microencapsulated with arrowroot starch in the simulated gastrointestinal tract (GIT) and yoghurt. **Foods**, v. 8, n. 5, p. 175, 2019.

SHAHBAZI, Yasser; SHAVISI, Nassim. Effects of Oregano Methanolic Extract on the Chemical, Microbial, and Sensory Properties of Yogurt. **Journal of Nutrition, Fasting and Health**, v. 7, n. 3, p. 138-145, 2019.

SHOJI, Adriana Sati et al. Viability of *L. acidophilus* microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 2, p. 83-88, 2013.

SILVA, M. P.; TULINI, F. L.; MATOS-JR, F. E.; OLIVEIRA, M. G.; THOMAZINI, M.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Application of spray chilling and electrostatic interaction to produce lipid microparticles loaded with probiotics as an alternative to improve resistance under stress conditions. **Food Hydrocolloids**, v. 83, p. 109-117, 2018.

TABASCO, Raquel et al. Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: resistance and metabolism. **Food microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1345-1352, 2011.

TALWALKAR, Akshat et al. Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. **International journal of food science & technology**, v. 39, n. 6, p. 605-611, 2004.

TAMIME, Adnan Y. et al. (Ed.). **Fermented milks**. Oxford, UK: Blackwell, 2006.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yoghurt: science and technology**. 2. ed. Oxford: Pergamon, 1999. p. 431.

TEIXEIRA, Bárbara et al. European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 36, n. 1, p. 81-87, 2012.

VAN DE GUCHTE, Maarten et al. Stress responses in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 82, n. 1, p. 187-216, 2002.

VITALI, A. A.; TEIXEIRA NETO, R. O.; MOURA, S. C. S. R. Introdução à cinética de reação em alimentos. In: MOURA, S. C. S. R.; GERMER, S. P. M. **Reações de transformação e vida-de-prateleira de alimentos processados**. 4. ed. Campinas: ITAL, 2010. p. 24-46.

WALKER, Marcia K. et al. Fruit yogurt processed with high pressure. **International journal of food science & technology**, v. 41, n. 4, p. 464-467, 2006.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. *Dairy Science and Technology*. 2. ed. London, CRC Press, 2006.

WILBEY, R. Andrew. Homogenization of Milk: Principles and Mechanism of Homogenization, Effects and Assessment of Efficiency: Valve Homogenizers. **Encyclopedia of dairy sciences**, p. 750-754, 2011.

WRIGHT, A. J.; Marangoni, A. G.; Hartel, R. W.; Lipids, M. Rheological Properties and Their Modification. **In Encyclopedia of Dairy Sciences**, Fuquay, J.W. Ed.; Academic Press: Massachusetts, 2011; pp 704–710.

WU, Sha et al. Effects of incubation temperature, starter culture level and total solids content on the rheological properties of yogurt. **International Journal of Food Engineering**, v. 5, n. 2, 2009.

ZANNINI, Emanuele et al. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 3, p. 1121-1135, 2016.

ZHI, Nan-Nan et al. Development of a dynamic prediction model for shelf-life evaluation of yogurt by using physicochemical, microbiological and sensory parameters. **CyTA-Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 42-49, 2018.