

STEPHANIE SILVA PINTO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO
DE MICROCÁPSULAS CONTENDO *Bifidobacterium* BB-12
PRODUZIDAS POR *SPRAY DRYING* COM SORO DE LEITE E
PREBIÓTICOS**

**Florianópolis
2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

Stephanie Silva Pinto

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO
DE MICROCÁPSULAS CONTENDO *Bifidobacterium* BB-12
PRODUZIDAS POR *SPRAY DRYING* COM SORO DE LEITE E
PREBIÓTICOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Dias de Mello Castanho Amboni

**Florianópolis
2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pinto, Stephanie Silva

Desenvolvimento, caracterização e aplicação de microcápsulas contendo Bifidobacterium BB-12 produzidas por spray drying com soro de leite e prebióticos / Stephanie Silva Pinto ; orientadora, Prof^a. Dr^a. Renata Dias de Mello Castanho Amboni - Florianópolis, SC, 2016. 157 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Microencapsulação. Probiótico. 3. Soro de leite. Prebióticos. 4. Nanofiltração. 5. Iogurte tipo grego. I. Amboni, Prof^a. Dr^a. Renata Dias de Mello Castanho . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO
DE MICROCÁPSULAS CONTENDO *Bifidobacterium* BB-12
PRODUZIDAS POR *SPRAY DRYING* COM SORO DE LEITE E
PREBIÓTICOS**

Por

Stephanie Silva Pinto

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 11 de março de 2016.

Prof.(a). Dr.(a). Roseane Fett
Coordenador

Banca examinadora:

Prof.(a). Dr.(a). Renata dias de Mello Castanho Amboni
Orientador (UFSC)

Prof.(a). Dr.(a). Neila Silvia Pereira dos Santos Richards,
Membro (UFSC)

Prof.(a). Dr.(a). Fábio Murakami,
Membro (UFPR)

Prof.(a). Dr.(a). Carmen Maria Oliveira Müller,
Membro (UFSC)

Prof.(a). Dr.(a). Elane Schwinden Prudêncio,
Membro (UFSC)

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu força de vontade e saúde para conquistar mais esta etapa;

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pelo aprendizado e oportunidade de realizar o doutorado;

A minha querida orientadora Prof^ª Renata Dias de Mello Castanho Amboni, por ter me aceito como sua aluna, pela dedicação, confiança, amizade e por todos os ensinamentos;

Aos meus pais Sergio e Beatriz pelo amor e apoio que me deram durante toda essa caminhada;

Ao meu namorado Mitchel por estar sempre ao meu lado, me dando apoio e me incentivando a ser mais confiante e otimista;

À Prof^ª Elane Prudêncio, por me acolher em seu laboratório, por todas as contribuições durante o trabalho e pelo constante apoio;

Às queridas colegas do Laboratório de Leite e Derivados, pela agradável companhia e por toda a ajuda. Em especial à Carlise e à Silvani pelo valioso auxílio em partes importantes do trabalho e às IC's Lara e Bianca que me acompanharam durante praticamente todo o doutorado, estando sempre prontas para ajudar nas análises de laboratório;

À Prof^ª Edna Amante por disponibilizar a estrutura do Laboratório de Frutas e Hortaliças;

Ao Prof. José Carlos Petrus por disponibilizar a estrutura do Laboratório de Processos de Separação com Membranas (LABSEM-EQA) e a Silvia Benedetti pelo grande auxílio com a utilização da unidade piloto de nanofiltração;

Ao Prof. Ernani Sant'Anna por disponibilizar a estrutura do Laboratório de Biotecnologia Alimentar e a Eunice Ilha por nunca ter me negado ajuda nas diversas vezes que eu solicitei;

Ao Prof. Fábio Murakami, pelo auxílio com as análises térmicas;

À Prof^ª Sandra Ferreira por disponibilizar a estrutura do Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC-EQA) para realização das determinações de densidade e a Kátia Andrade pelo auxílio com as análises;

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC, pela utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura;

À empresa Tate & Lyle pela doação da polidextrose e a Erika Arnosti pelo auxílio com o envio da amostra;

À empresa Clariant, pela doação da inulina;

À banca, por aceitar o convite de participação e pelas contribuições fornecidas.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos (PGCAL) da UFSC pelos ensinamentos e ao também ao secretário Sérgio de Souza pela disposição em me atender todas as vezes que precisei.

Ao Seu Bento, pela simpatia e por estar sempre disposto a ajudar.

A CAPES, pela bolsa de estudos e ao CNPq pelo apoio financeiro (Projeto Universal CNPq processo nº 471942/2012-0).

A todos que de alguma forma contribuíram e torceram por mim e pelo sucesso deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Este trabalho visou primeiramente desenvolver microcápsulas contendo o micro-organismo probiótico *Bifidobacterium* BB-12 através da técnica de *spray drying* utilizando soro de leite líquido ou o retentado do soro de leite obtido por nanofiltração, e prebióticos (inulina ou polidextrose) como agentes encapsulantes. Foram obtidas seis formulações de microcápsulas, as quais foram caracterizadas com relação às suas propriedades físicas (morfologia, tamanho de partícula, teor de umidade, atividade de água, densidade, tempo de dissolução em água e óleo, higroscopicidade, cor e propriedades térmicas). A viabilidade da bactéria probiótica nas microcápsulas também foi avaliada ao longo de 90 dias de armazenamento a 4 °C e a - 20 °C. A partir dos resultados, verificou-se que a utilização do retentado do soro de leite e a presença dos agentes prebióticos (inulina ou polidextrose) como agentes encapsulantes não influenciaram a viabilidade de *Bifidobacterium* BB-12 nem a morfologia das partículas. Além disso, as características físicas das microcápsulas foram pouco afetadas pela utilização do soro de leite ou do retentado obtido por nanofiltração como agentes encapsulantes. De maneira geral, as microcápsulas produzidas com soro de leite e inulina apresentaram características físicas mais adequadas, tais como menores valores de umidade, atividade de água e higroscopicidade, bem como maior tempo de solubilização em água. Além disso, os resultados das análises de DSC e TG sugeriram que a presença dos prebióticos melhorou a estabilidade das microcápsulas. Em uma segunda etapa, as microcápsulas produzidas somente com soro de leite, bem como as produzidas com soro de leite e inulina ou soro de leite e polidextrose, as quais apresentaram os melhores resultados nas análises anteriores, foram avaliadas com relação à sobrevivência do probiótico ao processo de *spray drying* (rendimento) e em condições adversas, tais como condições gastrointestinais simuladas e tratamentos térmicos (60, 65 e 70 °C por 5, 10 e 15 min). As microcápsulas produzidas somente com soro de leite foram as que apresentaram maior rendimento de microencapsulação (95,43%) e também conferiram maior proteção ao probiótico durante a exposição às condições gastrointestinais simuladas e aos tratamentos térmicos. Por outro lado, as microcápsulas produzidas com soro de leite e polidextrose não foram capazes de proteger a bactéria probiótica em tais condições. Assim, as microcápsulas produzidas somente com soro de leite e aquelas produzidas com soro de leite e inulina foram selecionadas para serem aplicadas em iogurte tipo grego. O produto foi avaliado quanto às suas

propriedades microbiológicas, físico-químicas, de textura e cor durante 28 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C. Além disso, a sobrevivência do probiótico no iogurte em condições gastrointestinais simuladas também foi avaliada. O iogurte tipo grego proporcionou um ambiente adequado para a sobrevivência da bactéria probiótica. Entretanto, a adição do probiótico na forma microencapsulada não melhorou a viabilidade da bactéria em comparação ao iogurte adicionado de bactéria na forma livre. De modo geral, a incorporação das microcápsulas no iogurte tipo grego afetou propriedades físico-químicas e de textura específicas em cada amostra, porém, não modificou a cor dos produtos. Todos os iogurtes apresentaram uma redução na sobrevivência do probiótico durante a simulação gastrointestinal, contudo, esta diminuição foi mais pronunciada no iogurte adicionado das microcápsulas produzidas com soro de leite e inulina.

Palavras-chave: Microencapsulação. Probiótico. Soro de leite. Prebióticos. Nanofiltração. Iogurte tipo grego.

ABSTRACT

This study primarily aimed to develop microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 by the spray drying technique using liquid whey or whey retentate obtained from nanofiltration, and prebiotics (inulin or polydextrose) as carrier agents. Six formulations of microcapsules were obtained and the microcapsules were then characterized in relation to their physical properties (morphology, particle size, moisture content, water activity, density, time to dissolve in water and in oil, hygroscopicity, color, and thermal properties). The viability of the probiotic bacteria in the microcapsules was also evaluated for 90 days at 4 °C and at – 20 °C. From the results it was verified that the use of liquid whey or whey retentate and the presence of prebiotics (inulin or polydextrose) as carrier agents did not influence the viability of *Bifidobacterium* BB-12 and the morphology of the particles. Moreover, the physical characteristics of the microcapsules were barely affected by the use of liquid whey or whey retentate obtained from nanofiltration as carrier agents. In general, the microcapsules produced with liquid whey and inulin had more desirable physical characteristics, such as lower values for moisture, water activity and hygroscopicity, as well as longer time to dissolve in water and oil. Besides, the results of the DSC and TG analysis suggested that prebiotics improved the stability of the microcapsules. In a second stage, the microcapsules produced only with whey, as well as the microcapsules produced with whey and inulin or whey and polydextrose, which have showed better results in the previous analyses, were evaluated in relation to the probiotic survival during spray drying process (encapsulation yield) and under stress conditions, such as simulated gastrointestinal conditions and heat treatments (60, 65 and 70 °C for 5, 10 and 15 min). The microcapsules produced only with whey showed the highest encapsulation yield (95.43%) and also conferred better protection of the probiotic during exposure to simulated gastrointestinal conditions and under heat treatments. On the other hand, the microcapsules produced with whey and polydextrose did not confer any protection to the probiotic cells in such conditions. Thus, the microcapsules prepared only with whey and those prepared with whey and inulin were selected for applying in Greek-style yogurt. The product was evaluated in relation to its microbiological, physicochemical, texture and color properties during 28 days of storage at 4 ± 1 °C. The survival of the probiotic bacteria in yogurt under simulated gastrointestinal conditions was also assessed. The Greek-style yogurt provided a suitable environment for maintaining

the viability of the probiotic bacteria. However, the addition of the probiotic microencapsulated did not improve the viability of the bacteria when compared to the yogurt containing probiotic in their free form. Overall, incorporation of microcapsules into Greek-style yogurt affected specific physicochemical and textural properties of the samples, but did not influence the color of the products. All the yogurts showed a reduction in the survival of the probiotic during the gastrointestinal simulation; however it was more pronounced in the yogurt added with microcapsules produced with whey and inulin.

Keywords: Microencapsulation. Probiotic. Whey. Prebiotic. Nanofiltration. Greek-style yogurt.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Esquema do processo de separação por membranas.....	34
Figura 1.2: Diferenças entre os processos de separação por membranas com relação à seletividade e a força motriz aplicada.	36
Figura 1.3: Comparação entre filtração convencional e tangencial.....	37
Figura 1.4: Componentes do leite: tamanho e processo de separação por membrana. MF: microfiltração, UF: ultrafiltração, NF: nanofiltração, OI: osmose inversa.	39
Figura 1.5: Morfologia de diferentes tipos de microcápsulas: A – matriz, B – microcápsula simples (mononuclear), C – microcápsula simples irregular, D – microcápsula com duas paredes, E – microcápsula com vários núcleos (polinuclear ou multinuclear), F – agrupamento de microcápsulas.	43
Figura 1.6: Representação esquemática do processo de microencapsulação pela técnica de <i>spray drying</i>	44
Figura 1.7: Estrutura representativa da inulina.....	49
Figura 1.8: Estrutura representativa da polidextrose. R= H, sorbitol ou outra polidextrose.....	50
Figura 1.9: Condições encontradas no trato gastrointestinal humano. .	53
Figure 2.1: Viability of <i>Bifidobacterium</i> BB-12 microcapsules during storage time, at 4 °C (a) and - 20 °C (b). W1: microcapsules with liquid whey (●); W2: microcapsules with liquid whey and inulin (■); W3: microcapsules with liquid whey and polydextrose (▲); WR1: microcapsules with whey retentate (○); WR2: microcapsules with whey retentate and inulin (□); WR3: microcapsules with whey retentate and polydextrose (Δ).	88
Figure 2.2: SEM images of microcapsules of <i>Bifidobacterium</i> BB-12 produced with: (a) liquid whey (W1), (b) liquid whey and inulin (W2), (c) liquid whey and polydextrose (W3), (d) whey retentate (WR1), (e) whey retentate and inulin (WR2) and (f) whey retentate and polydextrose (WR3).	89
Figure 2.3: SEM micrographs of fragmented microcapsules of <i>Bifidobacterium</i> BB-12 produced with: (a) whey retentate and inulin (WR2) and (b) whey retentate and polydextrose (WR3).	90
Figure 2.4: DSC curves of raw materials and <i>Bifidobacterium</i> BB-12 microcapsules. (a) W: spray dried liquid whey; WR: spray dried whey retentate; INU: inulin; PDX: polydextrose; (b) W1: microcapsules with	

liquid whey; W2: microcapsules with liquid whey and inulin; W3: microcapsules with liquid whey and polydextrose; (c) WR1: microcapsules with whey retentate; WR2: microcapsules with whey retentate and inulin; WR3: microcapsules with whey retentate and polydextrose.....96

Fig. 2.5: TG/DTG curves of microcapsules of *Bifidobacterium* BB-12 microcapsules produced with: (a) liquid whey (W1), liquid whey and inulin (W2), liquid whey and polydextrose (W3) and (b) whey retentate (WR1), whey retentate and inulin (WR2) and whey retentate and polydextrose (WR3).....98

Figure 3.1: Survival of free and microencapsulated *Bifidobacterium* BB-12 after each step of the simulated gastrointestinal conditions. SW: microcapsules only with sweet whey (■); SWI: microcapsules with sweet whey and inulin (●); SWP: microcapsules with sweet whey and polydextrose (▲); Free cells (◇)115

Figura 4.1: Contagens de células viáveis de *Bifidobacterium* BB-12, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* nas amostras de iogurte tipo grego contendo *Bifidobacterium* BB-12 na forma livre ou microencapsulada durante o armazenamento a 4 ± 1 °C. ■ Controle: iogurte adicionado de bifidobactéria na forma livre; □ SW: iogurte adicionado de bifidobactéria microencapsulada com soro de leite; ■ SWI: iogurte adicionado de bifidobactéria microencapsulada com soro de leite e inulina.134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Composição do leite bovino de raças ocidentais.	29
Tabela 1.2: Composição proteica das principais proteínas do leite bovino.	30
Tabela 1.3: Variação da composição dos soros de leite doce e ácido. .	32
Tabela 1.4: Sinônimos de iogurte concentrado e produtos similares em diferentes países.	58
Table 2.1: Composition and total solids content of feed solutions.	83
Table 2.2: Characteristics of microcapsules of <i>Bifidobacterium</i> BB-12 prepared with liquid whey, whey retentate obtained from nanofiltration (NF) and prebiotics.	91
Table 2.3: Color parameters of microcapsules of <i>Bifidobacterium</i> BB-12 prepared with liquid whey, whey retentate obtained from nanofiltration (NF) and prebiotics.	94
Table 2.4: The DSC of raw materials and microcapsules showing T_{peak} , T_{onset} and T_{endset} and enthalpy (ΔH) measurements.	97
Table 2.5: The TG measurements of microcapsules showing mass loss (Δm) with respective temperature range and DTG_{peak} temperature.	99
Table 3.1: Processing conditions used in each step of the simulated gastrointestinal conditions (adapted from Madureira et al., 2011, with modifications).	111
Table 3.2: Viable cells counts of <i>Bifidobacterium</i> BB-12 in the feed solutions and in the microcapsules produced with different carrier agents and the encapsulation yields (EY).	113
Table 3.3: Survival rates (%) of <i>Bifidobacterium</i> BB-12 free and microencapsulated after each step of the simulated gastrointestinal conditions.	115
Table 3.4: Effect of heat treatments on viable counts of <i>Bifidobacterium</i> BB-12 free and microencapsulated with different carrier agents.	118
Tabela 4.1: Caracterização físico-química das amostras de iogurte tipo grego adicionadas de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 livre ou microencapsulada no dia 1 de armazenamento ($4 \pm 1^\circ C$).	135
Tabela 4.2: Valores de pH, acidez titulável e sólidos totais das amostras de iogurte tipo grego adicionadas de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 livre ou microencapsulada durante 28 dias de armazenamento ($4 \pm 1^\circ C$).	136

Tabela 4.3: Parâmetros de textura das amostras de iogurte tipo grego adicionadas de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 livre ou microencapsulada durante 28 dias de armazenamento ($4 \pm 1^\circ\text{C}$).	138
Tabela 4.4. Sobrevivência de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 ($\log \text{UFC g}^{-1}$) nas amostras de iogurte tipo grego, armazenadas por 28 dias ($4 \pm 1^\circ\text{C}$), durante a exposição às condições gastrointestinais simuladas.....	140
Tabela 5.1: Caracterização físico-química do soro de leite e do retentado do soro obtidos por nanofiltração empregados na produção das microcápsulas.....	151

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aw	Atividade de água ou <i>Water activity</i>
CFU	<i>Colony-Forming Unit</i>
DP	Grau de polimerização ou <i>Degree of Polymerization</i>
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DSC	Calorimetria exploratória diferencial ou <i>Differential Scanning Calorimetry</i>
DVS	<i>Direct Vat Set</i>
EY	<i>Encapsulation Yield</i>
FRV	Fator de Redução Volumétrico
GRAS	Generally Recognized as Safe
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MRS	<i>DeMan-Rogosa-Sharpe</i>
NF	Nanofiltração ou <i>Nanofiltration</i>
PSM	Processos de Separação por Membrana
RH	<i>Relative Humidity</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscope</i>
TG	Análise termogravimétrica ou <i>Thermogravimetric Analysis</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
VRF	<i>Volume Reduction Factor</i>
WPC	<i>Whey Protein Concentrate</i>
WPI	<i>Whey Protein Isolate</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO 1 - Revisão bibliográfica.....	29
1.1 Leite.....	29
1.2 Soro de leite.....	31
1.3 Processos de separação por membrana (PSM).....	34
1.4 Probióticos.....	39
1.5 Microencapsulação.....	42
1.5.1 Agentes encapsulantes.....	45
1.5.1.1 Prebióticos.....	47
1.6 Caracterização de microcápsulas.....	51
1.7 Tolerância de probióticos às condições gastrointestinais.....	52
1.8 Aplicação de probióticos microencapsulados em iogurtes.....	55
1.9 Iogurte tipo grego.....	57
REFERÊNCIAS.....	59
CAPÍTULO 2 - Potencial da utilização de soro de leite concentrado e prebióticos como agentes encapsulantes na proteção de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 microencapsulada por <i>spray drying</i>	77
RESUMO	77
ABSTRACT	78
1.INTRODUCTION.....	78
2.MATERIALS AND METHODS	80
2.1. Manufacture of the liquid whey and whey retentate	80
2.2 Preparation of the bacterial suspension	81
2.3 Microencapsulation by spray drying	81
2.3.1. Preparation of the drying media	81
2.3.2 Spray drying	81
2.4 Viability of the microencapsulated bifidobacteria during storage time.....	84
2.5 Characterization of the microcapsules.....	84
2.5.1 Morphology and particle size	84
2.5.2 Moisture and water activity.....	84

2.5.3 Helium pycnometry.....	85
2.5.4 Hygroscopicity.....	85
2.5.5 Dissolution time.....	85
2.5.6 Color analysis.....	85
2.5.7 Differential scanning calorimetry (DSC).....	86
2.5.8 Thermogravimetric analysis (TG/DTG).....	86
2.6 Statistical analysis.....	86
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	86
3.1 Viability of microencapsulated bifidobacteria during storage time	86
3.2 Characterization of the microcapsules.....	88
4.CONCLUSIONS.....	99
REFERENCES.....	99

CAPÍTULO 3 - Influência da microencapsulação com soro de leite e prebióticos na sobrevivência de *Bifidobacterium* BB-12 submetida a condições gastrointestinais simuladas e a tratamentos térmicos.....105

RESUMO.....	105
ABSTRACT.....	106
1. INTRODUCTION.....	106
2. MATERIALS AND METHODS.....	108
2.1. Materials.....	108
2.2 Preparation of the bacterial suspension.....	109
2.3 Preparation of the drying media and microencapsulation.....	109
2.4 Enumeration of bifidobacteria.....	110
2.5 Encapsulation yield.....	110
2.6 Survival of free and microencapsulated cells under <i>in vitro</i> simulated gastrointestinal conditions.....	110
2.7 Survival of free and microencapsulated cells under heat treatments.....	112
2.8 Statistical analysis.....	112
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	112
3.1 Enumeration of the bifidobacteria and encapsulation yield.....	112
3.2 Survival of free and microencapsulated cells under <i>in vitro</i> simulated gastrointestinal conditions.....	114
3.3 Survival of the free and microencapsulated cells under heat treatment.....	117

4. CONCLUSION	119
REFERENCES	119

CAPÍTULO 4 - Efeito da incorporação de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 microencapsulada com soro de leite e inulina nas propriedades de iogurte tipo grego	123
---	-----

RESUMO	123
--------------	-----

ABSTRACT	124
----------------	-----

1. INTRODUÇÃO	124
---------------------	-----

2. MATERIAL E MÉTODOS	126
-----------------------------	-----

2.1 Material	126
--------------------	-----

2.2 Preparo da suspensão de células probióticas	127
---	-----

2.3 Preparo das soluções de alimentação e microencapsulação	127
---	-----

2.4 Fabricação do iogurte tipo grego	128
--	-----

2.5 Análises microbiológicas	128
------------------------------------	-----

2.6 Análises físico-químicas	129
------------------------------------	-----

2.7 Análise instrumental de textura	129
---	-----

2.8 Análise de cor	130
--------------------------	-----

2.9 Sobrevivência de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 em condições gastrointestinais simuladas	130
--	-----

2.10 Análise estatística	131
--------------------------------	-----

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	131
---------------------------------	-----

3.1 Análises microbiológicas	131
------------------------------------	-----

3.2 Análises físico-químicas	134
------------------------------------	-----

3.3 Análise instrumental de textura	137
---	-----

3.4 Análise de cor	139
--------------------------	-----

3.5 Sobrevivência de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 em condições gastrointestinais simuladas	139
--	-----

4. CONCLUSÃO	142
--------------------	-----

REFERÊNCIAS	143
-------------------	-----

CONCLUSÕES	149
------------------	-----

APÊNDICE	151
----------------	-----

APÊNDICE A	151
------------------	-----

ANEXOS	153
--------------	-----

ANEXO A – Artigo “Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect <i>Bifidobacterium</i> BB-12 microencapsulated by spray drying” publicado no “Food Research International” (ISSN: 0963-9969).....	153
ANEXO B – Artigo “Influence of microencapsulation with sweet whey and prebiotics on the survival of <i>Bifidobacterium</i> BB-12 under simulated gastrointestinal conditions and heat treatments” publicado no “LWT - Food Science and Technology” (ISSN: 0023-6438).....	154
Anexo C – Trabalhos apresentados em eventos.....	155

INTRODUÇÃO

Micro-organismos probióticos são conhecidos por proporcionar uma série de benefícios à saúde do consumidor, principalmente através da manutenção do equilíbrio e da composição do trato gastrointestinal, auxiliando na proteção do organismo contra a invasão de patógenos (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, et al., 2010; SAAD et al., 2013). As bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium* encontram-se entre os probióticos mais aplicados em alimentos (RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010).

Os iogurtes e demais leites fermentados são os derivados lácteos mais utilizados para incorporação de probióticos em virtude de sua grande aceitação pela população em geral e excelente valor nutricional (LOURENS-HATTINGH; VIJOEN, 2001; GRANATO et al., 2010). Nos últimos anos, o iogurte concentrado, também conhecido como iogurte grego, têm se tornado cada vez mais popular entre consumidores de diversos países (KILARA; CHANDAN, 2013; TAMIME; HICKEY; MUIR, 2014) e poderia ser empregado como carreador de micro-organismos probióticos. No entanto, alguns fatores podem influenciar a viabilidade e estabilidade de probióticos em iogurtes como, por exemplo, a pós-acidificação do produto, o teor de oxigênio dissolvido, interações com as culturas iniciadoras, bem como as condições de processamento e armazenamento (NG et al., 2011; MOHAMMADI et al., 2012).

Para que exerçam seus efeitos benéficos à saúde, os probióticos devem permanecer viáveis e em quantidade suficiente no alimento até o momento do consumo (MAKINEN et al., 2012), além de serem capazes de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal (WEICHSELBAUM, 2009). Neste contexto, métodos de microencapsulação têm sido aplicados com a finalidade de proteger os probióticos contra condições adversas a que são expostos, melhorando sua sobrevivência (BRINQUES; AYUB, 2011; RATHORE, et al., 2013). Dentre os métodos de microencapsulação, a técnica de *spray drying* apresenta algumas vantagens, como custo relativamente baixo, facilidade de operação, altas taxas de produção e possibilidade de aplicação em escala industrial (BURGAIN et al., 2011; GHANDI, et al., 2012).

Devido ao seu valor nutricional e por serem amplamente aplicadas em alimentos, as proteínas do soro de leite, principalmente na forma de concentrado ou isolado, têm sido empregadas como agentes encapsulantes de probióticos (GBASSI et al., 2009; YING et al., 2012;

GEBARA et al., 2013). O soro de leite é um importante coproduto da indústria de laticínios, devido ao grande volume produzido e a sua composição. Contudo, apesar do seu possível aproveitamento na fabricação de produtos lácteos, muitas vezes o soro de leite é tratado como resíduo (SISO, 1996; BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011). De acordo com Castro-Cislaghi et al. (2012), o emprego do soro de leite na forma líquida como agente encapsulante de probióticos mostra-se como uma alternativa tecnológica para seu aproveitamento. Levando em consideração que os processos de separação por membranas, como a nanofiltração, são úteis para concentração de componentes valiosos do soro de leite (ROMÁN et al., 2011), a utilização de soro de leite nanofiltrado como agente encapsulante de probióticos torna-se bastante promissora.

Com o intuito de aumentar a proteção das culturas probióticas microncapsuladas, diversos tipos de polissacarídeos têm sido aplicados em conjunto com as proteínas do soro (GBASSI et al., 2009; WICHCHUKIT et al., 2013; GEREZ et al., 2012; GEBARA et al., 2013; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2014). Polissacarídeos com alegações prebióticas, como é o caso da inulina e da polidextrose, apresentam potencial para serem utilizados como agentes encapsulantes de probióticos (CORCORAN et al., 2004; FRITZEN-FREIRE et al., 2012). No entanto, até o momento, não existem estudos visando o desenvolvimento e a caracterização de microcápsulas, contendo o probiótico *Bifidobacterium* BB-12, produzidas com soro de leite na forma líquida e prebióticos através da técnica de *spray drying*, bem como a aplicação destas microcápsulas em iogurte tipo grego.

A fim de abordar todos os aspectos supracitados, este trabalho, estruturado na forma artigos, está dividido nos seguintes capítulos:

(a) Capítulo 1 - **Revisão Bibliográfica**, abordando os principais temas envolvidos no trabalho: leite, soro de leite, processos de separação por membrana, probióticos, microencapsulação, agentes encapsulantes, prebióticos, caracterização de microcápsulas, tolerância de probióticos às condições gastrointestinais, aplicação de probióticos microencapsulados em iogurtes, e iogurte tipo grego.

(b) Capítulo 2 – **Potencial da utilização de soro de leite concentrado e prebióticos como agentes encapsulantes na proteção de *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada por *spray drying***, cujo objetivo foi investigar o potencial do retentado do soro de leite obtido por nanofiltração, em comparação com o soro de leite não concentrado, e prebióticos (inulina e polidextrose) como agentes encapsulantes de *Bifidobacterium* BB-12. Com este propósito, as microcápsulas obtidas

foram caracterizadas com relação as suas propriedades físicas, no dia em que foram produzidas, e a viabilidade da bactéria microencapsulada foi avaliada durante 90 dias de armazenamento a 4 °C e a - 20 °C.

(c) Capítulo 3 – **Influência da microencapsulação com soro de leite e prebióticos na sobrevivência de *Bifidobacterium* BB-12 submetida a condições gastrointestinais simuladas e a tratamentos térmicos**, cujo objetivo foi avaliar o efeito da microencapsulação por *spray drying*, utilizando soro de leite líquido e prebióticos (inulina e polidextrose) como agentes encapsulantes, na sobrevivência de *Bifidobacterium* BB-12 durante o processo de microencapsulação e em condições adversas, tais como condições gastrointestinais simuladas e tratamentos térmicos.

(d) Capítulo 4 – **Efeito da incorporação de *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada com soro de leite e inulina nas propriedades de iogurte tipo grego**, cujo objetivo foi desenvolver um iogurte tipo grego adicionado de *Bifidobacterium* BB-12 microencapsula com soro de leite líquido e inulina por *spray drying*, assim como avaliar o efeito da adição das microcápsulas nas propriedades microbiológicas, físico-químicas, de textura e cor durante 28 dias de armazenamento do produto a 4 ± 1 °C. Também foi avaliada a sobrevivência da bactéria probiótica na forma livre e microencapsulada no produto durante a exposição a condições gastrointestinais simuladas, após 28 dias de armazenamento.

Cabe ressaltar que a escolha das microcápsulas avaliadas no Capítulo 3, às quais foram produzidas com soro de leite líquido sem prévia concentração por nanofiltração e prebióticos, foi realizada de acordo com os resultados observados no Capítulo 2. Da mesma forma, a seleção das microcápsulas aplicadas em iogurte tipo grego (Capítulo 4) foi baseada nos resultados obtidos nos Capítulos 2 e 3.

Os artigos publicados em revistas indexadas (Anexos A e B) e os comprovantes dos trabalhos parciais publicados em eventos científicos da área de Ciência dos Alimentos (Anexo C) estão apresentados em anexo.

REFERÊNCIAS

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

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

BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 467- 483, 2011.

CASTRO-CISLAGHI, F. P. et al. *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 113, p. 186-193, 2012.

CORCORAN, B. M. et al. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1024-1039, 2004.

FRITZEN-FREIRE, C. B et al. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. **Food Research International**, v. 45, p.306-312, 2012.

GBASSI, G. K. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 103-105, 2009.

GEBARA, C. et al. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 51, p. 872-878, 2013.

GEREZ, C. L. et al. Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 to low pH. **Letters in Applied Microbiology**, v. 54, p. 552-556, 2012.

GHANDI, A. et al. Effect of shear rate and oxygen stresses on the survival of *Lactococcus lactis* during the atomization and drying stages of spray drying: a laboratory and pilot scale study. **Journal of Food Engineering**, v. 113, p. 194-200, 2012.

GRANATO, D. et al. Probiotic Dairy Products as Functional Foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p.455-470, 2010.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, L et al. *Lactobacillus plantarum* protection by entrapment in whey protein isolate: k-carrageenan complex coacervates. **Food Hydrocolloids**, v. 36, 181-188, 2014.

KILARA, A.; CHANDAN, R. C. Greek-style yogurt and related products. In: R. C. CHANDAN AND A. KILARA. **Manufacturing Yogurt and Fermented Milks**. Oxford: John Wiley & Sons, 2013. p. 297-318.

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

MAKINEN, K. et al. Science and technology for the mastership of probiotic applications in food product. **Journal of Biotechnology**, v. 162, p. 356-365, 2012.

MOHAMMADI, R.; SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A. M. The starter culture characteristics of probiotic microorganisms in fermented milks. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, p. 399-409, 2012.

NG, E. W.; YEUNG, M.; TONG, P. S. Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 169-175, 2011.

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

RATHORE, S. et al. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 369-381, 2013.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v. 27, p. 1-11, 2010.

ROMÁN, A. et al. Experimental investigation of the sweet whey concentration by nanofiltration. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 702-709, 2011.

SAAD, N. et al. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 1-16, 2013.

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

TAMIME, A.; HICKEY, M.; MUIR, D. Strained fermented milks – A review of existing legislative provisions, survey of nutritional labelling of commercial products in selected markets and terminology of products in some selected countries. **International Journal of Dairy Technology**, v. 67, 2014.

WICHCHUKIT, S. et al. Whey protein/alginate beads as carriers of a bioactive component. **Food Hydrocolloids**, v. 33, p. 66-73, 2013.

WEICHSELBAUM, E. Probiotics and health: a review of the evidence. **Nutrition Bulletin**, v. 34, p. 340-373, 2009.

YING, D. Y.; SANGUANSRI, L.; WEERAKKODY, R.; AUGUSTIN, M. A. Enhanced survival of spray-dried microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in the presence of glucose. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 597-602, 2012.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 LEITE

O leite é o produto da secreção das glândulas mamárias de fêmeas mamíferas, cuja função natural é a alimentação dos recém-nascidos (FOX, 2001; ORDÓÑEZ et al., 2005b). Quando avaliado do ponto de vista físico-químico, o leite é uma mistura homogênea de diferentes substâncias, como água, proteínas, lactose, gordura, sais minerais e vitaminas. Nesta mistura, as substâncias apresentam-se na forma de suspensão coloidal (micelas de caseínas e partículas lipoproteicas do soro), dispersão coloidal (proteínas globulares do soro), emulsão (glóbulos de gordura associados às vitaminas lipossolúveis) e solução verdadeira em água (lactose, sais minerais e vitaminas hidrossolúveis) (KOBELITZ, 2011). A aparência branca e opaca é resultado da dispersão das micelas de caseína e glóbulos de gordura, os quais são responsáveis pela difusão da luz incidente (NOZIÈRE et al., 2006). Já o sabor levemente adocicado está relacionado com o equilíbrio entre os diferentes componentes, como a lactose, o cloreto de sódio, a gordura e as proteínas (KOBELITZ, 2011).

A composição química do leite varia de acordo com a espécie, raça, estágio de lactação, volume de leite produzido, alimentação, local de criação, entre outros (SCHÖNFELDT; HALL; SMIT, 2012). A Tabela 1.1 apresenta a composição média do leite com relação às principais classes de compostos e à faixa dos valores médios do leite de raças bovinas ocidentais.

Tabela 1.1: Composição do leite bovino de raças ocidentais.

Componente	Porcentagem média	Variação entre as raças ocidentais ^a (porcentagens médias)
Água	86,6	85,4 - 87,7
Lipídios	4,1	3,4-5,1
Proteínas	3,6	3,3-3,9
Lactose	5,0	4,9-5,0
Cinzas	0,7	0,68-0,74

^a As raças ocidentais incluem *Guernsey*, *Jersey*, *Ayshine*, *Brown Swiss*, *Shorthorn* e *Holstein*.

Fonte: Damodaran, Parkin e Fennema (2010).

As proteínas são os mais importantes constituintes do leite tanto do ponto de vista nutricional como fisiológico. Além disso, as proteínas do leite também apresentam propriedades físico-químicas, funcionais e

tecnológicas distintas, que são amplamente exploradas na indústria de alimentos (FOX, 2001). Tradicionalmente, as proteínas do leite são classificadas em duas categorias principais, as caseínas e as proteínas do soro. As caseínas, o grupo mais abundante (Tabela 2), são fosfoproteínas, que em sua forma natural, apresentam-se formando agregados ou partículas (micelas) que consistem de diversas frações, sendo as majoritárias α_{s1} , α_{s2} , β e κ (SGARBIERI, 2005; RAIKOS, 2010). As caseínas α_{s1} , α_{s2} e β encontram-se na parte central da micela, enquanto que a caseína κ se distribui em parte no corpo da micela e em parte na superfície, conferindo-lhe estabilidade físico-química (SGARBIERI, 2005). A propriedade que distingue as caseínas é a sua insolubilidade em pH igual a 4,6 (ponto isoelétrico médio das caseínas) à 20 °C ou sob ação de enzimas proteolíticas (SGARBIERI, 1996; FOX, 2001), o que possibilita a produção de leites fermentados, como o iogurte, e de queijos por coagulação (KOBLOITZ, 2011). As proteínas do soro encontram-se dissolvidas na fase aquosa do leite e, ao contrário das caseínas, são solúveis em pH 4,6. Contudo, são menos resistentes ao tratamento térmico, sofrendo desnaturação em temperaturas acima de 70 °C (SGARBIERI, 2005; KOBLOITZ, 2011). As principais proteínas do soro de leite bovino são β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, imunoglobulinas e soroalbumina bovina (Tabela 1.2) (ORDÓÑEZ et al., 2005b).

Tabela 1.2: Composição proteica das principais proteínas do leite bovino.

Principais proteínas do leite	Concentração (g L ⁻¹)	Porcentagem da proteína total (m/m)
Proteína total	33	100
Caseína total	26	79,5
α_{s1}	10	30,6
α_{s2}	2,6	8,0
β	9,3	28,4
κ	3,3	10,1
Proteínas do soro	6,3	19,3
α -Lactoalbumina	1,2	3,7
β -Lactoglobulina	3,2	9,8
Soroalbumina bovina	0,4	1,2
Imunoglobulinas	0,7	2,1
Proteose peptona	0,8	2,4

Fonte: Walstra e Janness (1984) *apud* Raikos (2010).

Os triglicerídeos representam a maior porção dos lipídios do leite, compreendendo de 96 a 98% de seu total. Estes lipídios encontram-se dispersos na forma de glóbulos de 2 a 6 μ m de diâmetro, envoltos por

uma membrana lipoproteica, que evita sua coalescência e protege contra a ação de enzimas (JOST, 2007; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Outras classes de lipídios incluem fosfolipídios (0,8%), principalmente associados à membrana do glóbulo de gordura, e o colesterol (0,3%) (KOBLOITZ, 2011). Com relação à composição de ácidos graxos, os majoritários na gordura do leite bovino são os de cadeia longa, palmítico, oleico, mirístico e esteárico (ORDÓÑEZ et al., 2005b).

A lactose é o principal carboidrato do leite e também o componente mais abundante e mais constante em proporção. Apresenta gosto doce fraco e baixo poder adoçante (seis vezes menor que a sacarose) e, no leite, seu gosto doce é mascarado pela presença das caseínas (KOBLOITZ, 2011). Nos produtos lácteos, a lactose apresenta papel importante, sendo substrato da fermentação pelas bactérias lácticas, que a hidrolisam em galactose e glicose, e, posteriormente a convertem em ácido láctico (OLIVEIRA, 2009).

No leite encontram-se presentes todos os minerais considerados essenciais à dieta humana (KOBLOITZ, 2011). Os sais do leite consistem principalmente de fosfatos, citratos, cloretos, sulfatos, carbonatos e bicarbonato de sódio, potássio, cálcio e magnésio (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Em menor quantidade também são encontrados outros elementos como cobre, ferro, boro, manganês, zinco e iodo (ORDÓÑEZ et al., 2005b). Dentre estes sais destacam-se aqueles ligados as micelas de caseína, as quais contêm 8% dos sais do leite compostos basicamente de fosfato de cálcio e, ainda, quantidades significantes de magnésio e citrato (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Além disso, no leite também estão presentes diferentes tipos de vitaminas. As lipossolúveis A, D e E encontram-se associadas aos lipídios do leite, enquanto que as hidrossolúveis podem ser isoladas a partir do soro. O leite é considerado, ainda, uma excelente fonte de riboflavina (vitamina B₂), cianocobalamina (vitamina B₁₂), tiamina (vitamina B₁) e de vitamina A (ORDÓÑEZ et al., 2005b; KOBLOITZ, 2011).

1.2 SORO DE LEITE

O soro do leite é um líquido amarelo-esverdeado resultante da precipitação e remoção das caseínas do leite durante o processo de fabricação de queijos (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012). É um importante coproduto da indústria leiteira, uma vez que representa

de 85 a 90% do volume do leite e contém mais da metade de seus sólidos, incluindo proteínas, 20% da proteína total, e a maior parte da lactose, minerais, vitaminas solúveis (SINHA et al., 2007; BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011).

O tipo e a composição do soro dependem principalmente das técnicas utilizadas para separação das caseínas do leite. Dependendo do método empregado o soro pode ser classificado em soro ácido (pH < 5), quando é obtido a partir da coagulação do leite por adição de um ácido, e em soro doce (pH entre 6 e 7), quando é obtido pela ação de enzimas proteolíticas, como a quimosina. As principais diferenças entre os dois tipos de soro são o teor de minerais, a acidez e o teor das frações proteicas do soro (KOSSEVA et al., 2009; YADAV et al., 2015). A Tabela 1.3 apresenta a composição dos soros ácido e doce. Além disso, o tipo de leite utilizado na fabricação do queijo (vaca, cabra, búfala entre outros mamíferos) também influencia as características do soro de leite produzido (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013).

Tabela 1.3: Variação da composição dos soros de leite doce e ácido.

Componente	Soro doce (g L⁻¹)	Soro ácido (g L⁻¹)
Sólidos totais	63,0 - 70,0	63,0 - 70,0
Lactose	46,0 - 52,0	44,0 - 46,0
Proteínas	6,0 - 10,0	6,0 - 8,0
Cálcio	0,4 - 0,6	1,2 - 1,6
Fosfato	1,0 - 3,0	2,0 - 4,5
Lactato	2,0	6,4
Cloreto	1,1	1,1

Fonte: Panesar et al. (2007).

As proteínas do soro, representadas principalmente pela β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, soroalbumina bovina e imunoglobulina (Tabela 1.2), são reconhecidas pelo seu alto valor nutricional e biológico uma vez que apresentam excelente composição e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais e alta digestibilidade (SGARBIERI, 2005; MADUREIRA et al., 2007). Assim, as proteínas do soro são uma fonte rica em aminoácidos essenciais, quando comparadas com outros alimentos tipicamente proteicos (ovo, caseína, carne e soja), destacando-se os aminoácidos ramificados, leucina, isoleucina e valina (> 20%) e os aminoácidos sulfurados, metionina e cisteína (SMITHERS, 2008; MOLLEA; MARMO; BOSCO, 2013). Além das propriedades nutricionais, as proteínas do soro apresentam propriedades funcionais que conferem características físicas desejáveis quando utilizadas como ingrediente em alimentos, devido a sua alta

solubilidade, capacidade de absorção de água e capacidades emulsificantes e de formação de gel (GARCÍA-GARIBAY; JIMÉNEZ-GUZMÁN; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, 2008).

A indústria de laticínios em todo o mundo gera um volume bastante representativo de soro de leite. Considerando que para cada quilo de queijo produzido sejam originados entorno de 9 quilos de soro (SISO, 1996; SMITHERS, 2008), no ano de 2014 em que a produção mundial de queijo foi estimada em cerca de 21 milhões de toneladas (OECD/FAO, 2015), foram gerados em torno de 189 milhões de toneladas de soro. O soro oriundo da fabricação de queijos, além de poder ser empregado na produção de derivados lácteos como a ricota (PIZZILLO et al., 2005) e bebidas lácteas (CASTRO et al., 2008) pode ser submetido a diferentes tratamentos dando origem a produtos derivados com perfis específicos de proteínas, minerais, lipídios e açúcares (MADUREIRA et al., 2007). Técnicas de separação por membranas permitem a separação do soro em diversas frações, sendo possível o aproveitamento do soro na forma de lactose, soro em pó e concentrados proteicos com elevados teores de proteínas (*WPC – whey protein concentrate*, contendo tipicamente 35, 50, 65 ou 80% de proteínas ou *WPI – whey protein isolate*, contendo acima de 90% de proteínas) (SMITHERS, 2008; PERRONE; PEREIRA; CARVALHO, 2011; YADAV et al., 2015). De acordo com Kosseva et al. (2009) cerca de 50% da produção mundial de soro de leite é tratada e transformada em outros produtos alimentícios, sendo que, do total de soro aproveitado, aproximadamente 45% é empregado diretamente na forma líquida, 30 % é utilizado na produção de soro em pó, 15% destina-se a obtenção de produtos com e sem lactose e o restante é direcionado para obtenção de proteína concentrada do soro.

Apesar do possível aproveitamento do soro na obtenção destes produtos, muitas vezes ele ainda é tratado como resíduo e seu tratamento representa um sério problema devido a sua elevada carga orgânica (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011). Segundo Carvalho, Prazeres e Rivas (2013) o soro apresenta uma demanda química de oxigênio (DQO) entre 50 e 102 g L⁻¹ e uma demanda bioquímica de oxigênio entre 27 e 60 g L⁻¹, o que equivale a cem vezes a poluição do esgoto doméstico. Dessa forma, a identificação de alternativas para o aproveitamento adequado do soro de leite é de fundamental importância em função de sua qualidade nutricional, do volume produzido e de seu poder poluente.

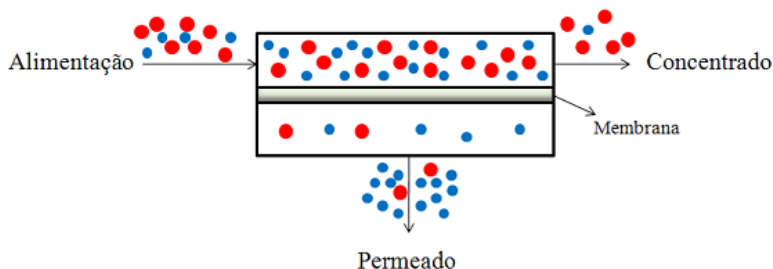
1.3 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANA (PSM)

Os processos de separação por membranas (PSM) têm sido empregados nos mais diferentes setores de atividade na indústria química, farmacêutica (HAELSSIG et al., 2011; WERHAN; FARSHORI; ROHR, 2012), biotecnológica (CHARCOSSET, 2006), alimentícia (SAXENA et al., 2009; MURAKAMI et al., 2013) e também em tratamento de águas residuais (MA et al., 2013). Quando comparado com os métodos convencionais de separação, os PSM apresentam diversas vantagens como alta seletividade; redução do gasto energético, pois tais processos não envolvem mudanças de fase; operação em temperaturas amenas, preservando as características nutricionais e sensoriais do produto obtido; e ser de fácil aplicação e operação (ORDÓÑEZ et al., 2005a; HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006; SAXENA et al., 2009).

Tais processos empregam membranas artificiais visando à concentração e/ou fracionamento de componentes de uma mistura (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006). De uma maneira geral, uma membrana é uma barreira que separa duas fases e que restringe total ou parcialmente o transporte de uma ou várias espécies químicas presentes nas fases (CHEN et al., 2008). Um filtro convencional também se encaixa na definição de membrana, no entanto, o termo “filtro” é normalmente limitado a estruturas que separam suspensões de partículas maiores do que 1-10 μm (FANE; WANG; JIA, 2008).

Nos PSM a alimentação é dividida em duas correntes distintas, o concentrado ou retentado, e o permeado. O concentrado é a fração que não permeia a membrana, enquanto que o permeado é a fração que passa através da membrana, conforme pode ser observado na Figura 1.1 (CHEN et al., 2008).

Figura 1.1: Esquema do processo de separação por membranas.



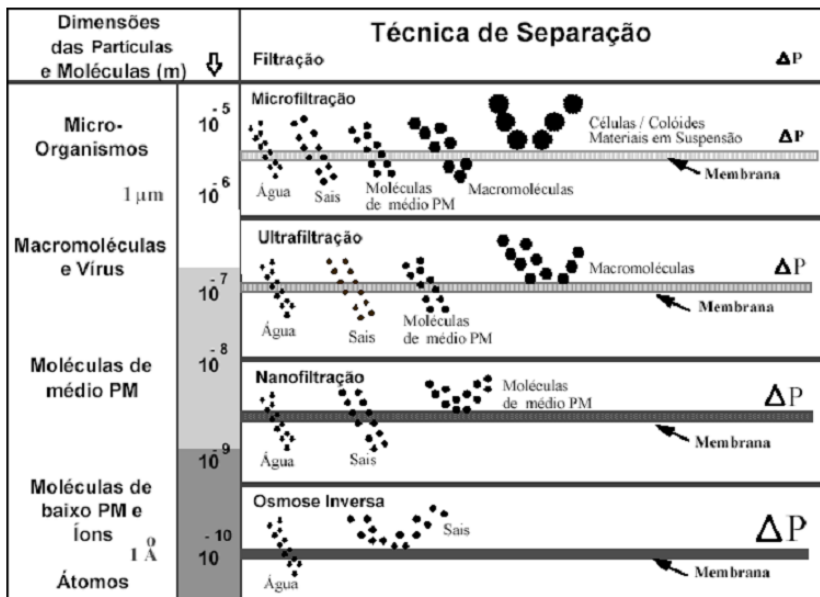
Fonte: Silva (2010).

As membranas utilizadas nos PSM podem ser classificadas de acordo com a estrutura morfológica, natureza (material), e configuração modular (CHERYAN, 1998). De acordo com a sua morfologia as membranas podem ser classificadas em densas e porosas. Nas membranas porosas o transporte através da mesma ocorre devido à diferença de tamanho entre as partículas e os poros da membrana, sendo que o mecanismo de transporte é a convecção. Por outro lado, as membranas densas não possuem poros e o transporte dos componentes envolve a sorção das moléculas na superfície da membrana, a difusão através do material que constitui a membrana e por fim, a dessorção das moléculas no lado do permeado. Além disso, tanto as membranas densas como as porosas podem ser isotrópicas ou anisotrópicas, ou seja, podem ou não apresentar as mesmas características morfológicas ao longo de sua espessura (MULDER, 1996; HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006).

As membranas são dispostas em módulos que as acomodam e oferecem suporte. A configuração modular destas estruturas pode apresentar tanto a geometria plana (placa-quadro e espiral) como a geometria cilíndrica (tubular, capilar e fibra oca) (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006; ZHANG et al., 2012). Além disso, estes módulos devem possuir canais para alimentação e para a remoção do concentrado e do permeado, além de atender a características de interesse, como ter alta razão de área de permeação por volume ocupado; baixo custo de fabricação; facilidade de operação e limpeza; e possibilidade e facilidade de troca da membrana (DEBON, 2009).

Para que ocorra o transporte através da membrana é necessária uma força motriz agindo sobre a mesma (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006). Normalmente, a força motriz utilizada para atingir o fluxo desejado é o gradiente de pressão hidrostática, contudo, em alguns casos, gradientes de concentração e potencial elétrico também são empregados (ROSENBERG, 1995; CHEN et al., 2008). Dentre os PSM que utilizam pressão como força motriz encontram-se a microfiltração (MF), a ultrafiltração (UF), a nanofiltração (NF) e a osmose inversa (OI), os quais se diferenciam pelo tamanho médio do poro da membrana e pela pressão necessária para promover a separação (Figura 1.2). Quanto menor o tamanho do poro da membrana maior é a pressão necessária para promover a passagem do fluido através da membrana. As faixas de pressão utilizadas nestes processos estão entre 0,2 a 3,5 bar para a microfiltração; 0,5 a 5 bar para a ultrafiltração; 1,5 a 40 bar para a nanofiltração; e de 20 a 100 bar para a osmose inversa (CHERYAN, 1998).

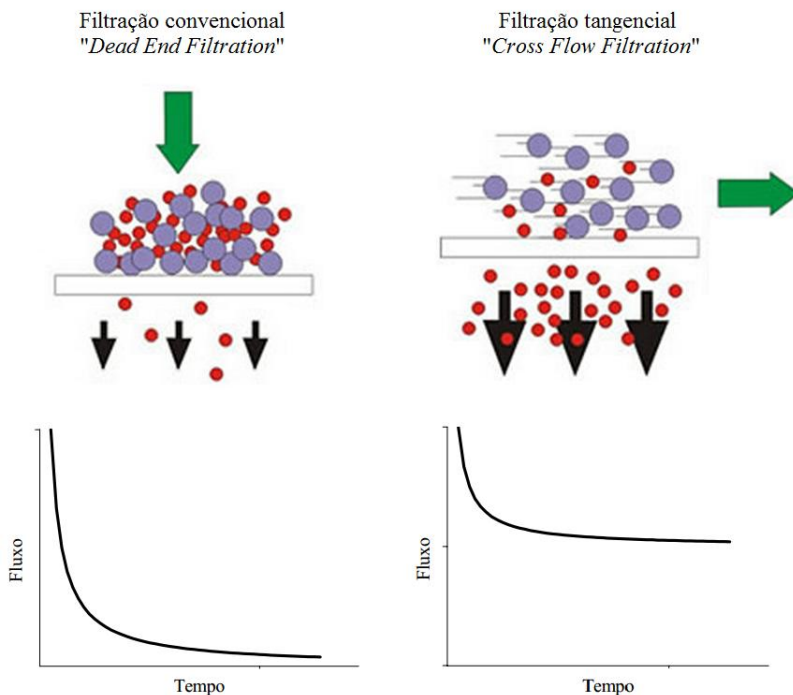
Figura 1.2: Diferenças entre os processos de separação por membranas com relação à seletividade e a força motriz aplicada.



Fonte: Habert, Borges e Nóbrega (2006).

Dois métodos de filtração podem ser utilizados nos PSM; o método de filtração convencional ou perpendicular (*dead-end filtration*) e a filtração tangencial (*cross-flow filtration*) (Figura 1.3) (CHERYAN, 1998). Na filtração convencional o escoamento do fluido ocorre perpendicularmente à superfície da membrana, fazendo com que os solutos se depositem sobre a mesma, o que resulta em uma diminuição considerável do fluxo do permeado e torna necessário interromper o processo para limpeza da membrana (DZIEZAK, 1990; MULDER, 1996). Por outro lado, na filtração tangencial o fluido escoava paralelamente à superfície da membrana, permitindo o arraste contínuo dos solutos, enquanto que o permeado é transportado perpendicularmente, o que possibilita manter o fluxo e torna o processo mais eficiente (BAKER 2004; HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006).

Figura 1.3: Comparação entre filtração convencional e tangencial.



Fonte: Silva (2010).

Alguns parâmetros são importantes para avaliar o desempenho operacional dos processos de separação por membranas, como por exemplo, o fluxo do permeado, o fator de redução volumétrico e o coeficiente de retenção. O fluxo do permeado (J) (Equação 1.1) representa a quantidade de fluido que passa através da membrana em um determinado tempo, onde V_p é a quantidade de permeado coletado durante um tempo t e A é a área da superfície de permeação da membrana, sendo normalmente expresso em $L/m^2.h$. O fator de redução volumétrico (FRV) (Equação 1.2) avalia a redução do volume do fluido de alimentação durante o processo, ou seja, a relação entre o volume do alimentado (V_a) e o volume do retentado (V_r). Já o coeficiente de retenção (R) (Equação 1.3) avalia a qualidade do processo de separação com relação a um determinado componente de interesse, onde C_p é a concentração do composto no permeado e C_r é a concentração do composto no retentado (MULDER, 1996; CHERYAN, 1998).

$$J = \frac{V_p}{A \times t} \quad (1.1)$$

$$FRV = \frac{V_a}{V_r} \quad (1.2)$$

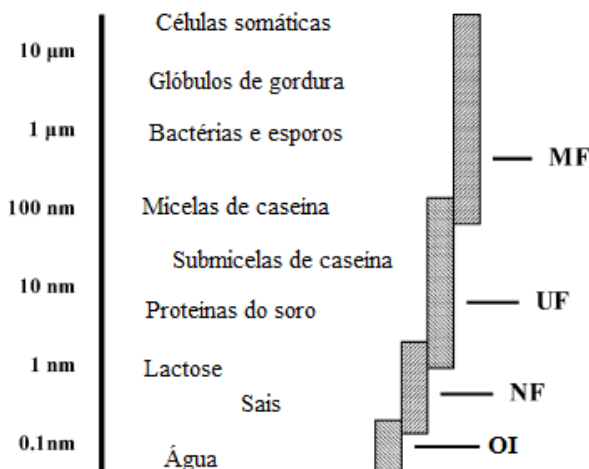
$$R = \left(1 - \frac{C_p}{C_r}\right) \times 100 \quad (1.3)$$

Mesmo quando se utiliza o método de filtração tangencial se observa uma redução contínua do fluxo do permeado com o tempo (Figura 1.3). Este declínio é atribuído a alguns fenômenos decorrentes do processo, tais como a polarização da concentração, a camada de gel polarizada e o efeito *fouling* (entupimento dos poros da membrana) (CHERYAN, 1998). A polarização da concentração ocorre devido ao aumento na concentração dos solutos retidos próximos à superfície da membrana, formando um gradiente de concentração entre a superfície da membrana e a zona da corrente de alimentação (CHERYAN, 1998; HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006). Quando a concentração das partículas próximas à superfície filtrante excede seu limite de solubilidade, ocorre a formação de uma camada de gel polarizada, resultado da precipitação por supersaturação das macromoléculas, ocasionando um aumento a resistência ao fluxo do permeado. A polarização da concentração é considerada um fenômeno reversível, e pode ser minimizada através de mudanças nas condições de operação (CHERYAN, 1998; BASSETTI, 2002; DEBON, 2009). Além da camada gel polarizada, ocorre durante a filtração o *fouling*, o qual provoca alterações irreversíveis nas propriedades da membrana sendo caracterizado pela deposição e acúmulo de solutos na superfície e dentro dos poros. Como o *fouling* é causado por interações específicas entre os componentes do alimentado e a membrana, não pode ser minimizado através de modificações das condições hidrodinâmicas do sistema, sendo necessária a aplicação de processos de limpeza (SAXENA, 2009).

Os PSM apresentam diversas aplicações na indústria de laticínios, sendo empregados para concentração e fracionamento dos componentes do leite (Figura 1.4) (BRANS et al., 2004). A ultrafiltração e a nanofiltração são aplicadas para processamento de soro de leite com o intuito de aumentar o conteúdo de proteínas e obter produtos comerciais conhecidos como *whey protein concentrate* (WPC). Entretanto, a produção de WPC utilizando ultrafiltração não soluciona completamente o problema de reutilização do soro uma vez que o permeado ainda contém grandes quantidades de lactose e sais, apresentando uma alta DQO (ATRA et al., 2005; BUTYLINA; LUQUE; NYSTRÖM, 2006).

Dessa forma, o emprego da nanofiltração é útil para concentração de componentes valiosos do soro, sendo mais econômico que a evaporação, uma vez que não utiliza calor (ROMÁN et al., 2011).

Figura 1.4: Componentes do leite: tamanho e processo de separação por membrana. MF: microfiltração, UF: ultrafiltração, NF: nanofiltração, OI: osmose inversa.



Fonte: Adaptado de Brans et al. (2004).

1.4 PROBIÓTICOS

O termo probiótico é uma palavra relativamente nova que significa “para a vida”. De acordo com a FAO/WHO (2006) probióticos são definidos como micro-organismos vivos que quando ingeridos em quantidades apropriadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Dessa forma, os alimentos que contêm esses micro-organismos se enquadram na categoria de alimento funcional (SAAD et al., 2013).

De acordo com Correia, Liboredo e Consoli (2012) os principais efeitos benéficos atribuídos aos probióticos estão relacionados com o aumento da mobilidade intestinal, o que evita o crescimento excessivo de bactérias (modulação da microbiota intestinal), com a melhoria das funções da barreira intestinal e com a modulação da resposta imune. Dentre os benefícios relatados na literatura se destacam a proteção contra patógenos, redução dos níveis de colesterol e pressão arterial, atividade anticarcinogênica, melhoria na absorção de nutrientes, redução

da intolerância a lactose, alívio da constipação, entre outros (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010; TRIPATHI; GIRI, 2014). Contudo, é importante salientar que os efeitos benéficos atribuídos aos probióticos são específicos de cada cepa, ou seja, não existe uma cepa capaz de proporcionar simultaneamente todos os benefícios mencionados (WEICHSELBAUM, 2009; MAKINEN et al., 2012; JUNGENSEN et al., 2014).

A seleção de um micro-organismo para ser empregado como probiótico é baseada em critérios específicos. Um importante critério é que deve ser de origem humana, uma vez que normalmente os produtos são destinados ao consumo humano e visto que estes micro-organismos adaptam-se melhor em ambiente semelhante ao qual foram isolados. Ademais, o micro-organismo probiótico deve ser seguro para a saúde (reconhecido como GRAS - *Generally Recognized as Safe*); deve sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal, ou seja, deve ser resistente a baixos valores de pH e também à ação de enzimas hidrolíticas; e deve ser capaz de aderir à mucosa intestinal e de inibir a fixação de bactérias patogênicas (PLESSAS et al., 2012).

A maioria dos probióticos são bactérias pertence aos gêneros *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium* (RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010; SAAD et al., 2013). Os micro-organismos pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* são bastonetes gram-positivos não formadores de esporos, sem motilidade e anaeróbios estritos. Possuem morfologia variada, podendo ser uniforme ou bifurcada em forma de Y ou V (RUSSELL et al., 2010; PRASANNA; GRANDISON; CHARALAMPOPOULOS, 2014). Embora o gênero *Bifidobacterium* seja considerado estritamente anaeróbio, existem algumas cepas capazes de sobreviver em presença de oxigênio. No entanto, o grau de tolerância ao oxigênio depende da espécie da bifidobactéria e do meio de cultura, assim como da morfologia celular (PRASANNA; GRANDISON; CHARALAMPOPOULOS, 2014). O pH ótimo para o crescimento de *Bifidobacterium* varia entre 6,0 e 7,0, não apresentando praticamente nenhum crescimento em pHs abaixo de 4,5 e acima de 8,5. A temperatura ótima para crescimento está entre 37 e 41 °C, sendo que as temperaturas mínimas e máximas estão entre 25 e 28 °C e 43 e 45 °C, respectivamente (SHAH, 2007; RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010). Algumas das espécies deste gênero empregadas como micro-organismos probióticos são *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium*

longum, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium thermophilus*, entre outras (SAAD et al., 2013).

A cepa *Bifidobacterium* BB-12[®], pertence à coleção de culturas lácteas da empresa Chr. Hansen e foi selecionada especialmente para a aplicação em produtos lácteos probióticos, uma vez que apresenta alta tolerância ao oxigênio, boa estabilidade e tolerância ao ácido e bile, além de não afetar negativamente o sabor e a aparência do alimento. Na época em que foi isolada, em 1983, foi considerada como pertencente à espécie *Bifidobacterium bifidum*. Através de técnicas de classificação mais modernas ela foi reclassificada, primeiramente como *Bifidobacterium animalis*, e depois como uma nova espécie, *Bifidobacterium lactis*. Contudo, mais tarde foi demonstrado que a classificação *B. lactis* não atendia completamente aos critérios da espécie e, assim, a nomenclatura foi incluída como uma subespécie. Portanto, atualmente, a cepa *Bifidobacterium* BB-12[®] é classificada como *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (JUNGERSEN et al., 2014).

Para que os efeitos benéficos sejam alcançados os micro-organismos probióticos devem estar presentes em quantidades apropriadas no alimento e serem ingeridos diariamente (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008). Assim, a ingestão diária mínima recomendada deve estar situada entre 10^8 e 10^9 células viáveis, o que pode ser alcançado com o consumo diário de pelo menos 100 g de um produto contendo entre 10^6 – 10^7 células viáveis por grama (BOYLSTON et al., 2004). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece que a quantidade mínima viável para os probióticos na recomendação diária do produto pronto para o consumo deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) e que esta quantidade deve estar declarada no rótulo do alimento. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove a eficácia através de laudo da quantidade mínima viável do micro-organismo até o final do prazo de validade e teste de resistência da cultura utilizada à acidez gástrica e aos sais biliares (BRASIL, 2015).

Probióticos têm sido tradicionalmente empregados em produtos de origem láctea, como iogurtes (NG; YEUNG; TONG, 2011; BEDANI et al., 2013), diversos tipos de queijos (RODRÍGUES-HUEZO et al. 2014; VERRUCK et al. 2015), sorvetes (PINTO et al., 2012; BEZERRA et al., 2015) e outras sobremesas (ARAGON-ALEGRO et al., 2007; BURITI; CASTRO; SAAD, 2010). Contudo, o maior desafio na produção de alimentos probióticos encontra-se na manutenção da viabilidade destes micro-organismos, uma vez que sua sobrevivência

está relacionada com uma série de fatores, como pH, exposição ao oxigênio durante o processamento e embalagem, incompatibilidade com as bactérias de culturas iniciadoras, e também tempo e temperatura de estocagem (SHAH, 2007; de VOS et al., 2010). Além disso, depois de ingeridos os probióticos ainda precisam sobreviver às condições adversas durante sua passagem pelo trato gastrointestinal para que sejam capazes de influenciar a composição da microbiota do intestino (WEICHSELBAUM, 2009). Dessa forma, visando manter a viabilidade de probióticos durante o processamento, armazenamento e passagem do alimento pelo trato gastrointestinal métodos como microencapsulação têm sido amplamente estudados (FRITZEN-FREIRE et al., 2013b; GEBARA et al., 2013, RAJAM; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014; RIBEIRO et al. 2014).

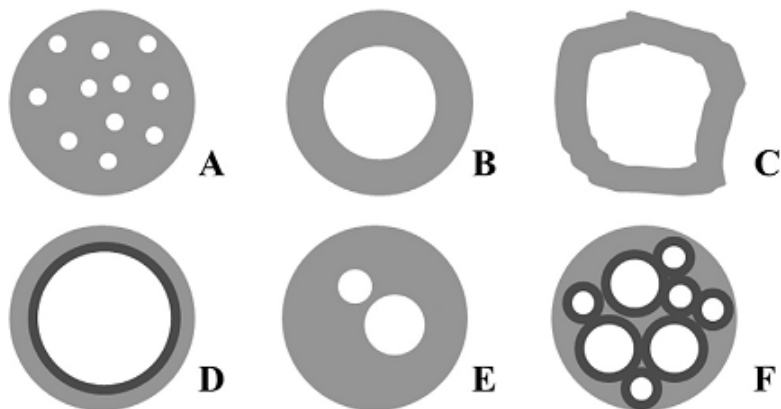
1.5 MICROENCAPSULAÇÃO

Microencapsulação é definida como uma técnica de empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas extremamente pequenas, as quais podem liberar seu conteúdo de maneira controlada sob a influência de condições específicas (DESAI; PARK, 2005). O material a ser encapsulado pode ser puro ou uma mistura, sendo denominado como material ativo ou núcleo, enquanto que o material que forma a cápsula é chamado de material de revestimento ou de parede, carreador ou agente encapsulante (FANG; BHANDARI, 2010). Normalmente, microcápsulas apresentam forma esférica, com diâmetro compreendido entre 1,0 e 5000 μm . (FANG; BHANDARI, 2012). No entanto, o tamanho, a forma, e a estrutura das microcápsulas dependem dos materiais empregados como agentes encapsulantes e do método empregado na produção.

O material a ser encapsulado pode ficar localizado na região central da cápsula ou estar disperso em uma matriz contendo o agente encapsulante (ESTEVINHO et al., 2013). O primeiro grupo caracteriza as “verdadeiras” microcápsulas, enquanto que o segundo resulta nas chamadas micropartículas ou microesferas. A principal diferença está no fato de que nas micropartículas uma pequena fração do material ativo permanece exposta na superfície. Contudo, o termo “encapsulação” tem sido empregado em seu sentido mais amplo, englobando tanto a formação de microcápsulas como de micropartículas. As microcápsulas podem ter ainda mais de um núcleo, sendo denominadas como multinuclear ou polinuclear, ou apresentar várias paredes para um

mesmo núcleo (AZEREDO, 2005). A Figura 1.5 apresenta alguns dos principais modelos de microcápsulas.

Figura 1.5: Morfologia de diferentes tipos de microcápsulas: A – matriz, B – microcápsula simples (mononuclear), C – microcápsula simples irregular, D – microcápsula com duas paredes, E – microcápsula com vários núcleos (polinuclear ou multinuclear), F – agrupamento de microcápsulas.



Fonte: Adaptado de Estevinho et al. (2013).

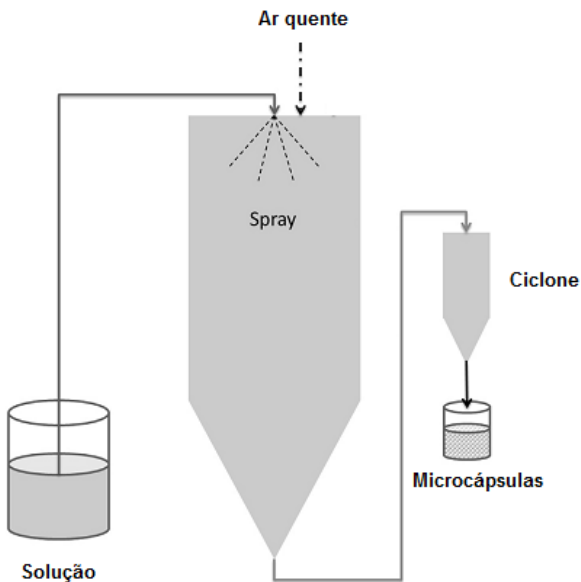
Na indústria de alimentos, a microencapsulação vem sendo empregada com vários propósitos, como por exemplo, para estabilizar o material ativo encapsulado, controlar reações de oxirredução, promover liberação controlada, mascarar sabor, cor e odor desagradáveis, estender a vida útil e proteger componentes contra perdas nutricionais (ANAL; SINGH, 2007; BURGAIN et al., 2011). Diversos ingredientes ativos têm sido encapsulados, incluindo lipídios, vitaminas, peptídeos, ácidos graxos, antioxidantes, minerais, aromas, enzimas e também micro-organismos probióticos (DESAI; PARK, 2005; FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008; de VOS et al., 2010).

A microencapsulação de culturas probióticas é realizada com o intuito de proteger estes micro-organismos contra condições adversas às quais são expostos durante o processamento e armazenamento dos alimentos, e também durante a passagem pelo trato gastrointestinal, onde devem resistir ao baixo pH estomacal e a presença dos sais de bile (DING; SHAH, 2009; COOK et al., 2012; RATHORE, et al., 2013).

Várias técnicas são utilizadas para microencapsular culturas probióticas, tais como *spray drying*, extrusão, emulsificação, coacervação, liofilização, entre outras (NAZZARO et al., 2012;

MARTÍN et al., 2015). A técnica de *spray drying* é a mais comumente empregada na microencapsulação de probióticos e envolve a atomização de uma suspensão de células (material ativo) em uma solução contendo o agente encapsulante por uma corrente de ar quente, resultando em rápida evaporação da água. A temperatura de entrada do ar quente normalmente varia entre 150 e 220 °C, promovendo a evaporação instantânea do solvente, e em seguida a temperatura decresce para valores moderados (50 a 80 °C). O produto microencapsulado em forma de pó é separado do ar quente por um ciclone e recolhido em sua parte inferior. Dependendo das condições de operação e do tipo de agente encapsulante pode ser produzido um pó fino (10 a 50 µm) ou partículas maiores (2 a 3 mm) (GHARSALLAOUI et al., 2007; de VOS et al., 2010; RATHORE et al., 2013). A Figura 1.6 apresenta um esquema do processo de microencapsulação por *spray drying*.

Figura 1.6: Representação esquemática do processo de microencapsulação pela técnica de *spray drying*.



Fonte: Adaptado de Estevinho et al. (2013).

Quando comparada com outros métodos de microencapsulação, a técnica de *spray drying* apresenta algumas vantagens, como custo relativamente baixo, facilidade de operação, alta reprodutibilidade e possibilidade de aplicação em escala industrial (BURGAIN et al., 2011;

GHANDI, et al., 2012). Por outro lado, a necessidade de exposição dos micro-organismos a altas temperaturas pode prejudicar a integridade celular, levando a diminuição da viabilidade dos probióticos encapsulados (GOLOWCZYCA et al., 2011; ARSLAN et al., 2015). Assim, diversos estudos têm avaliado a viabilidade de probióticos submetidos ao processo de *spray drying* (ANANTA; VOLKERT; KNORR, 2005; FRITZEN-FREIRE et al., 2012; YING et al., 2012; AVILA-REYES et al. 2014; KHEM; SMALL; MAY, 2016). No geral, estes estudos mostraram que os probióticos podem ser significativamente protegidos através do método de *spray drying*, sendo que a sobrevivência das culturas durante o processo e subsequente estocagem do pó está relacionada com o tipo de cepa utilizada, com as temperaturas de entrada e saída no equipamento e com o tipo de agente encapsulante.

1.5.1 Agentes encapsulantes

Vários materiais têm sido utilizados, sozinhos ou em conjunto, para microencapsular culturas probióticas, tais como alginato (GBASSI et al., 2009; SATHYABAMA et al. 2014), goma arábica (RODRÍGUEZ-HUEZO et al., 2007), goma gelana (NAG, HAN, SINGH, 2011), quitosana (de PRISCO et al., 2014; YONEKURA et al. 2014), maltodextrina (SEMYONOV et al., 2010), amido (ETCHEPARE et al., 2016), derivados do leite como proteínas (caseínas e proteínas do soro), leite em pó desnatado e soro de leite (DOHERTY et al., 2011; CASTRO-CISLAGHI, et al., 2012; MACIEL et al., 2014), prebióticos (inulina, oligofrutose, polidextrose) (FRITZEN-FREIRE, et al., 2012; OKURO et al., 2013; KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014), entre outros.

As proteínas do soro de leite apresentam grande potencial para serem empregadas como agente encapsulante de probióticos, uma vez que são totalmente biodegradáveis e amplamente aplicadas em alimentos (GBASSI et al., 2009), devido a seu alto valor nutricional e habilidade de formar gel, emulsões e filmes. Além disso, a habilidade de formar gel e microcápsulas sem a utilização de tratamentos térmicos severos ou quaisquer produtos químicos permite que as proteínas do soro sejam empregadas em sistemas de liberação controlada em alimentos (WICHCHUKIT et al., 2013).

Assim, as proteínas concentradas (WPC) e isoladas (WPI) do soro de leite, têm sido aplicadas como agente encapsulante de probióticos em diversos trabalhos, sendo consideradas efetivas no

aumento da sobrevivência destes micro-organismos durante a secagem em *spray drying*, armazenamento e exposição às condições do trato gastro intestinal. Picot e Lacroix (2004) verificaram que a contagem de células viáveis de *Bifidobacterium longum* R070 encapsulada com WPI pelo método de *spray drying* foi significativamente maior que as células livres após 28 dias de armazenagem (4 °C) em iogurte e após exposição a condições gastrointestinais simuladas. Ying et al. (2010) observaram que utilização da técnica de *spray drying* na microencapsulação de *Lactobacillus rhamnosus* GG com WPI foi mais eficaz que a técnica de liofilização, aumentando a estabilidade da bactéria durante o armazenamento a 25 °C. Rajam e Anandharamakrishnan (2014) avaliaram o efeito da combinação de fruto-oligossacarídeos (FOS) com WPI, na forma nativa ou desnaturada, como agentes encapsulantes de *Lactobacillus plantarum* por *spray drying*. Os autores observaram que a combinação de FOS com WPI desnaturada foi mais efetiva na manutenção da viabilidade do probiótico após o *spray drying*, durante a estocagem e em condições gastrointestinais simuladas, quando comparada as microcápsulas produzidas somente com FOS ou com FOS e WPI nativa.

Por outro lado, poucos trabalhos avaliaram o emprego do soro de leite na forma líquida como agente encapsulante. Castro-Cislaghi et al. (2012) investigaram a sobrevivência às condições gastrointestinais simuladas e tolerância ao NaCl de *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada por *spray drying* com soro de leite líquido, avaliando também a viabilidade da bactéria durante o armazenamento a 4°C. Os autores observaram uma pequena redução na viabilidade da bactéria encapsulada em pH baixo, porém, a microencapsulação com soro de leite não protegeu as células probióticas durante à exposição aos sais de bile e não influenciou a suscetibilidade da cultura ao NaCl. Contudo, durante o armazenamento, a viabilidade permaneceu constante durante 12 semanas. Jantzen, Göpel e Beermann (2013) empregaram soro de leite líquido para o cultivo e subsequente microencapsulação de *Lactobacillus reuteri* por *spray drying*. As microcápsulas obtidas apresentaram redução de aproximadamente 1 log na viabilidade do micro-organismo durante o armazenamento a 4 °C por 4 semanas. No entanto, o micro-organismo microencapsulado apresentou maior sobrevivência que as células livres durante a exposição a condições gastrointestinais simuladas.

De acordo com Lopez-Rúbio et al. (2009), a combinação entre proteínas e polissacarídeos como agente encapsulantes tem se mostrado bastante interessante, uma vez que estas moléculas são consideradas

anfífilas e desempenham um papel importante na estabilização de formulações alimentícias. Dessa forma, com o intuito de aumentar a proteção das culturas probióticas microncapsuladas, vários polissacarídeos têm sido aplicados em conjunto com as proteínas do soro, como por exemplo, alginato (GBASSI et al., 2009), pectina (GEREZ et al., 2012; GEBARA et al., 2013) e carragena (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2014). Além desses polissacarídeos, agentes prebióticos também apresentam potencial para serem utilizados como agentes encapsulantes durante a microencapsulação de probióticos (CORCORAN et al. 2004; FRITZEN-FREIRE et al. 2012), podendo ser empregados juntamente com o soro de leite visando a melhoria da sobrevivência destes microorganismos.

1.5.1.1 Prebióticos

Prebióticos foram primeiramente definidos em 1995 por Gibson e Roberfroid como ingredientes alimentícios não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, por estimularem seletivamente o crescimento e/ou atividade de um número limitado de bactérias do cólon. Alguns anos depois, esta definição foi atualizada por seus autores, que definiram prebióticos como ingredientes seletivamente fermentados que conferem mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo benefícios para a saúde e bem estar do hospedeiro (GIBSON et al., 2004; ROBERFROID, 2007). Contudo, a fim de cumprir estes critérios, tais ingredientes devem ser capazes de resistir à acidez gástrica, à hidrólise pelas enzimas pancreáticas e a absorção gastrointestinal, além de serem seletivamente fermentados por gêneros específicos de bactérias do cólon, os quais compreendem principalmente bifidobactérias e lactobacilos (LOMAX; CALDER, 2009; CHARALAMPOPOULOS; RASTALL, 2011).

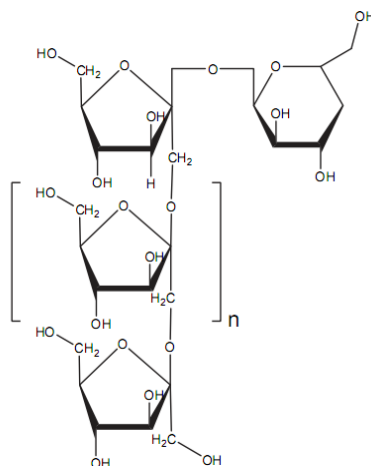
Uma variedade de efeitos benéficos tem sido associada ao consumo de prebióticos, incluindo aumento da biodisponibilidade de minerais, particularmente cálcio, modulação do sistema imune, prevenção ou melhoria na gravidade e duração de infecções gastrointestinais, regulação de desordens metabólicas relacionadas à obesidade e redução do risco de câncer (CHARALAMPOPOULOS; RASTALL, 2011).

Até o momento, todos agentes prebióticos descritos são carboidratos de cadeia curta, com grau de polimerização (DP) variando entre 2 e 60, não digeríveis pelo organismo humano ou por enzimas

digestivas de origem animal (SAAD et al., 2013). Eles podem ser obtidos através de extração direta de fontes naturais, produzidos por meio de processos químicos de hidrólise de polissacarídeos, ou pela síntese química ou enzimática de dissacarídeos (MUSSAMATTO; MANCILHA, 2007). A inulina e os fruto-oligossacarídeos (FOS) são os ingredientes prebióticos mais estudados e empregados em alimentos (GIBSON et al., 2004). Porém, outros ingredientes com alegações prebióticas, como os galacto-oligossacarídeos (GOS), isomalto-oligossacarídeos (IMO), xilo-oligossacarídeos (XOS), oligossacarídeos da soja (SOS), lactulose e polidextrose também foram estudados (WANG, 2009; SAAD et al., 2013; KONDEPUDI et al., 2012) .

A inulina é um polissacarídeo composto por ligações do tipo β (2,1) entre unidades de frutose, na maioria das vezes contendo um resíduo de glicose no final da cadeia (Figura 1.7) (CARABIN; FLAMM, 1999). Está presente em diversas plantas como carboidrato de reserva, podendo ser encontrada em cebola (1 a 5%, base seca), alho (4 a 12%) e banana (0,2%). Contudo, as raízes da chicória são utilizadas como a principal matéria prima para extração industrial, uma vez que contém de 15 a 20% de inulina (BOSSCHER, 2009). A inulina nativa extraída da chicória apresenta DP variando entre 3 e 60 unidades de monossacarídeos, com média ao redor de 10 unidades. A hidrólise enzimática da inulina nativa é empregada na produção de oligofrutose, a qual possui DP variando de 2 a 8 (MEYER et al., 2011). Através de processos de separação específicos a inulina nativa pode ser purificada, removendo frações com baixos DP, o que possibilita a obtenção da inulina com alto DP entre 23 e 25, sendo denominada como inulina *high performance* (HP) (GLIBOWSKI; PIKUS, 2011). As propriedades físicas e funcionais da inulina estão relacionadas com seu grau de polimerização. A inulina de cadeia longa é menos solúvel, mais viscosa e termoestável que a inulina de cadeia curta. Assim, quando dispersa em água ou leite, apresenta a capacidade de formar microcristais, que podem interagir, resultando em uma textura suave e cremosa. Devido a esta característica, a inulina de cadeia longa é mais indicada para ser empregada como substituto de gordura (GUGGISBERG et al., 2009; APOLINÁRIO et al., 2014; KARIMI et al., 2015).

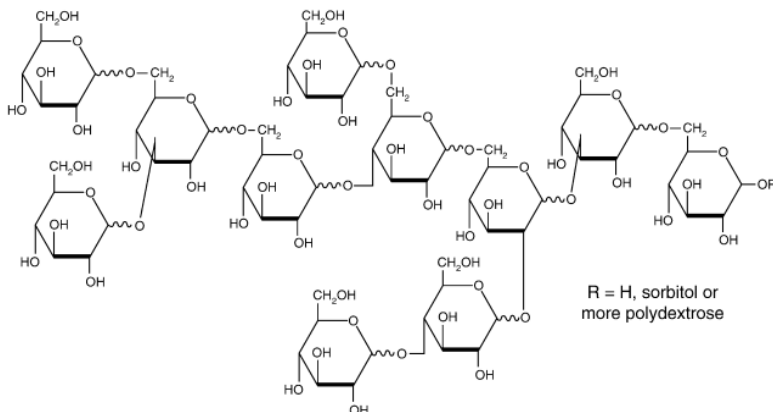
Figura 1.7: Estrutura representativa da inulina.



Fonte: de Vos et al. (2010)

A polidextrose é um polissacarídeo sintético de baixa massa molar, altamente ramificado e composto por ligações entre unidades de glicose (Figura 1.8) (STOWEEL, 2009; RANINEN et al. 2011). Nesse polímero, todas as possibilidades de ligações glicosídicas com o carbono anomérico estão presentes (α e β (1 \rightarrow 2), (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 6)). Entretanto, as cadeias com ligações do tipo (1 \rightarrow 6) são predominantes (FLOOD; AUERBACH; CRAIG, 2004). A polidextrose é obtida pela policondensação a vácuo da glicose com uma pequena quantidade de sorbitol e ácido cítrico como catalisadores (CRAIG et al., 1998). A polidextrose apresenta um grau de polimerização médio de 12 e valor calórico de apenas 1 Kcal/g. O baixo conteúdo calórico da polidextrose é resultado de sua baixa digestibilidade no intestino delgado e da parcial fermentação no intestino grosso (OLIVEIRA et al., 2009). A polidextrose pode ser incorporada em uma grande variedade de alimentos e bebidas em substituição a carboidratos de alto valor calórico. Contudo, como a polidextrose é apenas ligeiramente doce, edulcorantes com gosto doce mais intenso costumam ser adicionados em conjunto a fim de ajustar a doçura do produto (STOWEEL, 2009).

Figura 1.8: Estrutura representativa da polidextrose. R= H, sorbitol ou outra polidextrose.



Fonte: Stowell (2009).

Prebióticos, como os fruto-oligossacarídeos (FOS), inulina e polidextrose, também têm sido aplicados, normalmente associados com outros materiais, como agentes encapsulantes de culturas probióticas (ANANTA et al., 2005; FRITZEN-FREIRE et al., 2012; OKURO et al. 2013; KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014; RAJAM; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014). Fritzen-Freire et al. (2012) verificaram que a utilização de uma mistura de prebióticos (inulina enriquecida com oligofrutose) e leite em pó desnatado reconstituído como agente encapsulante para a bactéria *Bifidobacterium* BB-12 resultou em uma maior proteção do probiótico durante a estocagem (4 e -18 °C) das microcápsulas. Também, estudos realizados por Okuro et al. (2013) verificaram que a utilização dos prebióticos inulina e polidextrose, especialmente de polidextrose, como co-encapsulantes de *Lactobacillus acidophilus* auxiliou na proteção do micro-organismo quando exposto às condições gastrointestinais simuladas e também durante o armazenamento (7 e -18 °C) por 120 dias. Por fim, Krasaekoopt e Watchapoka (2014) observaram que adição de galacto-oligossacarídeos ou inulina durante a microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* com alginato e quitosana aumentou a resistência destes micro-organismos ao baixo pH e a presença de sais de bile, quando comparada as microcápsulas sem prebióticos (controle).

1.6 CARACTERIZAÇÃO DE MICROCÁPSULAS

O efeito protetor conferido aos probióticos através da microencapsulação depende das características físicas da matriz que constitui as microcápsulas (HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2012). Dessa maneira, o conhecimento das características físicas das microcápsulas se torna essencial para a otimização de processos e funcionalidades, assim como para redução de custos (BARBOSA-CÁNOVAS; JULIANO, 2005).

A umidade e atividade de água (A_w) são fatores críticos que influenciam na estabilidade da cápsula e do micro-organismo probiótico durante o armazenamento (MENG et al., 2008; HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2010). Segundo Chávez e Ledebor (2007) um conteúdo de umidade abaixo de 5% e atividade de água menor que 0,25 são geralmente aceitos para garantir a estabilidade do micro-organismo microencapsulado. A higroscopicidade é outra propriedade associada com a estabilidade das microcápsulas durante o armazenamento, enquanto que a solubilidade está diretamente relacionada com a reconstituição dos pós (TONON et al., 2009).

A microscopia é uma ferramenta útil para monitorar a formação das microcápsulas. Além disso, é capaz de fornecer informações sobre o intervalo de tamanho de partículas e possíveis alterações na microestrutura da matriz encapsulante (ALLAN-WOJTAS; HANSEN; PAULSON, 2008). De acordo com Rosenberg, Kopelman e Talmon (1985) a microscopia eletrônica de varredura (MEV) é indicada para estudar a superfície de microcápsulas, sendo possível verificar a integridade e porosidade das mesmas (presença de rachaduras ou poros).

O tamanho da partícula é outro parâmetro físico importante que deve ser avaliado, uma vez tem influência sobre a capacidade de reidratação e solubilidade de pós, assim como na mistura de componentes e na compactação e separação de uma mistura. Além disso, este parâmetro também pode influenciar o aroma, a textura e a aparência dos alimentos (O'HAGAN et al., 2005; KUROZAWA; PARK; HUBINGER, 2009), sendo desejável obter microcápsulas com tamanho menor que 100 μm a fim de evitar um impacto negativo sobre as características sensoriais (BURGAIN et al., 2011).

O estudo das propriedades térmicas (calorimetria e termogravimetria) também é interessante para a caracterização de microcápsulas. Através da técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) pode-se acompanhar os efeitos de calor associados com alterações físicas ou químicas da amostra, tais como transições de

fase, como ponto de fusão, e reações de desidratação, de decomposição, etc., capazes de causar variações de calor. Por outro lado, a análise termogravimétrica (TG) permite, através das curvas de variação de massa em função da temperatura, tirar conclusões sobre a estabilidade térmica da amostra (IONASHIRO, 2004).

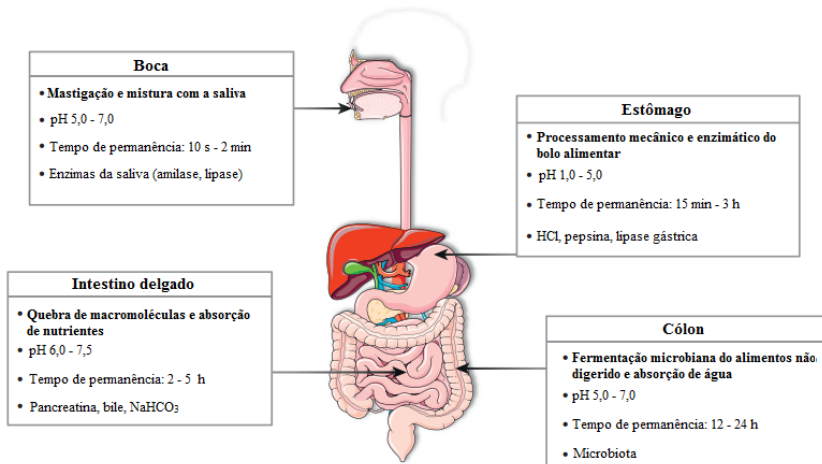
O rendimento da microencapsulação é uma medida que combina a eficiência da tecnologia de microencapsulação com a sobrevivência das células viáveis durante o processo, sendo dependente do tipo de agente encapsulante utilizado. Geralmente é calculado comparando-se a contagem de células viáveis contidas na solução de alimentação com a contagem obtida nas cápsulas. Dessa forma, a principal razão para que se obtenha um rendimento de encapsulação inferior a 100% é o dano causado pelo próprio processo de encapsulação, como aquecimento, no caso de microencapsulação pela técnica de *spray drying* (HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2012).

Por fim, a sobrevivência de probióticos microencapsulados durante a passagem pelo trato gastrointestinal também está relacionada com as características da matriz encapsulante, a qual deve manter sua integridade até o momento de liberação no cólon (TRABELSI et al., 2013; YONEKURA et al., 2014). Além disso, a microencapsulação também é utilizada para proteger as células em tratamentos térmicos aplicados no processamento de alimentos, reduzindo potencialmente injúrias e morte celular (DING; SHAH, 2007; SABIKHI et al., 2010; TRABELSI et al., 2013).

1.7 TOLERÂNCIA DE PROBIÓTICOS ÀS CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS

Após a ingestão do alimento, os micro-organismos probióticos devem ser capazes de resistir à passagem pelo trato gastrointestinal, mantendo-se viáveis e em quantidades apropriadas para que possam colonizar o intestino e promover seus efeitos benéficos (HUANG; ADAMS, 2004; DEL PIANO et al., 2011). Contudo, as drásticas condições encontradas no trato gastrointestinal no que diz respeito a variações de pH, presença de enzimas e sais biliares (Figura 1.9) podem provocar uma diminuição considerável na viabilidade das células probióticas (GBASSI et al. 2011; COOK et al. 2012; KENT; DOHERTY, 2014).

Figura 1.9: Condições encontradas no trato gastrointestinal humano.



Fonte: Adaptado de Guerra et al. (2012).

O suco gástrico produzido no estômago normalmente constitui a maior barreira para os probióticos (DEL PIANO et al., 2011). O baixo pH e a ação antimicrobiana da pepsina são os principais fatores que afetam a sobrevivência dos probióticos no estômago. O pH estomacal geralmente situa-se entre 2,5 e 3,5, entretanto também pode ser menor, na faixa de 1,0 a 2,0, quando são produzidas taxas mais elevadas de suco gástrico, ou que até mesmo maior do que 6,0 logo após a ingestão do alimento (HUANG, 2004; RANADHEERA et al., 2012). O efeito prejudicial do baixo pH sob a viabilidade das bactérias está relacionado com a acidificação do citoplasma o que leva ao aumento no consumo de energia para manutenção do pH intracelular e à inibição de reações enzimáticas (COTTER; HILL, 2003; SHABALA et al. 2006).

Após a passagem pelo estômago, os micro-organismos probióticos ingeridos chegam ao intestino delgado onde são expostos à ação da pancreatina e dos sais biliares (RANADHEERA et al., 2012). Segundo Del Piano et al. (2011) estes componentes são responsáveis pela redução de aproximadamente 35 a 40% na viabilidade dos probióticos. A bile é uma secreção digestiva que facilita a digestão e absorção de componentes hidrofóbicos da dieta. Dessa forma, a natureza antimicrobiana dos sais de bile reside principalmente na sua propriedade detergente, que afeta os fosfolipídios e as proteínas da membrana celular das bactérias (BEGLEY; GAHAN; HILL, 2005; MADUREIRA et al., 2011).

Contudo, o efeito das condições do trato gastrointestinal sobre a viabilidade dos probióticos é dependente da espécie e do tipo de cepa. Liu et al. (2007) avaliaram a tolerância 38 cepas de bifidobacteria frente às condições encontradas no trato gastrointestinal humano e verificaram que, dentre as cepas avaliadas, a *B. breve* A04 apresentou melhor sobrevivência. Além disso, os aspectos relacionados com a natureza da matriz alimentar, tais como teor de proteína e gordura, tipo de proteína, pH e presença de determinados ingredientes, também exercem influência sobre a resistência dos probióticos quando expostos às condições do trato gastrointestinal (BURNS et al. 2014; CASAROTTI; TODOROV; PENNA, 2015). Ranadheera et al. (2012) observaram que a tolerância gastrointestinal *in vitro* de *Propionibacterium jensenii* 702, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 incorporadas sorvetes foi maior do que quando incorporadas em iogurte natural e iogurte com suco de frutas.

O emprego da microencapsulação tem sido sugerido como um método promissor para minimizar a perda de viabilidade de microorganismos probióticos durante a passagem pelo trato gastrointestinal (COOK et al. 2012; KAILASAPATHY, 2014). Diversas pesquisas mostram que a sobrevivência de um probiótico microencapsulado às condições gastrointestinais varia de acordo com a técnica empregada e com o tipo de agente encapsulante. Rajam et al. (2012) verificaram que o probiótico *Lactobacillus plantarum* microencapsulado pela técnica de *spray drying* apresentou maior tolerância à bile do que quando microencapsulado pela técnica de liofilização, ambas empregando proteína isolada do soro de leite e alginato de sódio como agentes encapsulantes. Fritzen-Freire et al. (2013a) observaram que a substituição parcial de leite desnatado reconstituído pelos prebióticos inulina ou inulina enriquecida com oligofrutose conferiu maior proteção à bactéria probiótica *Bifidobacterium BB-12* microencapsulada por *spray drying* quando exposta a condições gastrointestinais. Maciel et al. (2014) verificaram que a utilização tanto de leite desnatado reconstituído como de soro de leite doce como matrizes encapsulantes de *Lactobacillus acidophilus* La-5 foram eficientes na proteção do probiótico à simulação gastrointestinal, embora as microcápsulas produzidas com leite tenham favorecido o aumento da viabilidade do *L. acidophilus*.

Devido à complexidade de estudos *in vivo*, a maioria das pesquisas utiliza metodologias *in vitro* para avaliar a sobrevivência de probióticos às condições do trato gastrointestinal. Entretanto, até o momento não há um consenso internacional sobre a utilização de um

protocolo padronizado para analisar a resistência de micro-organismos nestas condições (BURNS et al. 2014). A metodologia desenvolvida por Madureira et al. (2011) tem sido recentemente empregada para avaliação da tolerância de probióticos tanto na forma microencapsulada (RODRIGUES et al. 2011; LI et al., 2014; SOUZA et al. 2015) como adicionados em diferentes matrizes alimentares (OLIVEIRA et al., 2014; VERRUCK et al. 2015; ROLIM et al., 2015; MEIRA et al. 2015). Esta metodologia simula de maneira sequencial as condições tipicamente encontradas nas diferentes seções do trato gastrointestinal (boca, esôfago e estômago, duodeno e íleo), incluindo a presença de enzimas (α -amilase, pepsina e pancreatina), variações de pH, intervalos de tempo e intensidades de agitação (para simular os movimentos peristálticos) característicos de cada seção (MADUREIRA et al. 2011).

1.8 APLICAÇÃO DE PROBIÓTICOS MICROENCAPSULADOS EM IOGURTES

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, Instrução Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007 (BRASIL, 2007) “entende-se por Leites Fermentados os produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de micro-organismos específicos”. A mesma legislação, com relação ao iogurte, define que é “o produto incluído na definição de leites fermentados cuja fermentação se realiza com cultivos protosimbóticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, aos quais, de forma complementar, outras bactérias ácido-lácticas podem acompanhar devido à sua atividade, que pode contribuir para a determinação das características do produto final”. Estes micro-organismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade.

No entanto, manter a viabilidade de células probióticas em níveis aceitáveis em iogurtes durante o armazenamento nem sempre é uma tarefa simples. De acordo com Mohammadi, Sohrabvandi e Mortazavian (2012), o pH e a acidez titulável são reportados como os principais fatores que restringem o crescimento e a estabilidade de probióticos em leites fermentados. Após a fermentação e durante o armazenamento refrigerado normalmente ocorre a pós-acidificação do iogurte, a qual é caracterizada pelo decréscimo do pH e aumento da acidez do produto. A

pós-acidificação ocorre principalmente devido ao crescimento prolongado das cepas de *L. bulgaricus* em pH e temperatura baixos. Uma vez que os micro-organismos probióticos não se desenvolvem bem em pH menor do que 4,4, uma redução substancial na viabilidade pode ser observada (LOURENS-HATTINGH; VIJOEN, 2001; VASILJEVIC; SHAH, 2008). Além da pós-acidificação, outros fatores como níveis de oxigênio e peróxido de hidrogênio dissolvidos, interações com as culturas iniciadoras e condições de armazenamento podem influenciar a sobrevivência dos probióticos no iogurte (NG et al. 2011; MOHAMMADI; SOHRABVANDI; MORTAZAVIAN, 2012).

Visto que a alta sobrevivência dos probióticos é de extrema importância para que estes exerçam sua funcionalidade, o estudo da viabilidade de probióticos microencapsulados aplicados em iogurte bem como sua influência nas propriedades físicas, químicas e sensoriais do produto tem sido alvo de diversas pesquisas. Brinques e Ayub (2010) avaliaram a viabilidade de *L. plantarum* microencapsulado com alginato de sódio e quitosana pela técnica de emulsificação em iogurte e observaram uma redução de apenas 0,55 log UFC g⁻¹ após 38 dias de armazenamento. Shoji et al. (2013) verificaram que a adição de *L. acidophilus* microencapsulado por coacervação seguida de liofilização em iogurtes preparados com leite de búfala resultou em menor pós-acidificação do produto e maior viabilidade da bactéria durante 28 dias de estocagem, quando comparada ao iogurte adicionado de probiótico na forma livre. Mousa et al. (2014) avaliaram as características microbiológicas, físico-químicas, de textura e sensoriais de iogurte firme adicionado de *Bifidobacterium bifidum* F-35 microencapsulado pela técnica de emulsificação. As microcápsulas foram produzidas somente com proteína concentrada do soro de leite (uma camada) ou com proteína concentrada do soro do leite e alginato (duas camadas). A microencapsulação com duas camadas aumentou a sobrevivência do probiótico, quando comparado com o iogurte adicionado de células livres, e também conduziu a menores valores de acidez, maior firmeza e melhor aceitabilidade sensorial.

Embora os resultados de caracterização de iogurtes com microcápsulas sejam bastante promissores, especialmente no que diz respeito à viabilidade dos probióticos durante o armazenamento, também é importante avaliar a resistência destes micro-organismos no produto quando expostos às condições do trato gastrointestinal. Entretanto, poucos estudos têm sido realizados neste aspecto. Ribeiro et al. (2014) investigaram o efeito da aplicação de *L. acidophilus* LA-5 microencapsulado por gelificação iônica e coacervação complexa,

utilizando pectina e concentrado proteico de soro como agentes encapsulantes nas características de iogurte batido ao longo de 35 dias de armazenamento do produto. Também foi avaliada a sobrevivência do probiótico microencapsulado frente às condições do trato gastrointestinal após 35 dias de armazenamento do iogurte. Os autores observaram que, quando comparado ao iogurte com probiótico na forma livre, o iogurte adicionado de probiótico microencapsulado apresentou menor pós-acidificação e maior sobrevivência do micro-organismo probiótico, tanto durante o armazenamento como durante a simulação das condições gastrointestinais.

Nos últimos anos, o iogurte grego tem se tornado cada vez mais popular entre os consumidores brasileiros (EUROMONITOR INTERNATIONAL, 2015) e de outros países (KILARA; CHANDAN, 2013; TAMIME; HICKEY; MUIR, 2014), principalmente em virtude de sua textura mais consistente. De acordo com Abd El-Salam et al. (2011), o iogurte grego apresenta potencial para incorporação de micro-organismos probióticos devido ao seu alto teor de sólidos totais. Contudo, até o momento não existem trabalhos que avaliaram o efeito da aplicação de probióticos microencapsulados neste tipo de produto.

1.9 IOGURTE TIPO GREGO

O iogurte grego ou iogurte concentrado, conhecido como *strained yogurt* na Europa, é um produto fermentado semissólido obtido a partir do iogurte tradicional através da drenagem de parte de seus componentes solúveis (NSABIMANA; JIANG; KOSSAH, 2005; DESAI; SHEPARD; DRAKE, 2013). É caracterizado por apresentar maior teor de sólidos totais que o iogurte tradicional, coloração branca/creme, textura macia e suave, boa espalhabilidade, pouca sinerese e gosto levemente ácido (NSABIMANA; JIANG; KOSSAH, 2005; KILARA; RAMESH; CHANDAN, 2013).

Os iogurtes concentrados recebem diversas denominações ao redor do mundo as quais variam em função do tipo de leite utilizado na fabricação (vaca, cabra, ovelha, búfala) e da composição microbiológica. A Tabela 1.4 apresenta algumas denominações empregadas a iogurtes concentrados e produtos similares em diferentes países. Contudo, estes produtos compartilham características em comum, como a presença da etapa de concentração após a fermentação do leite, no caso de produtos feitos pelo método tradicional, bem como o fato de empregarem bactérias ácido-láticas como culturas iniciadoras (TAMIME; HICKEY; MUIR, 2014).

Tabela 1.4: Sinônimos de iogurte concentrado e produtos similares em diferentes países.

Denominação	Origem
<i>Labneh, Labaneh, Labna</i>	Países do Mediterrâneo Oriental (Grécia, Líbano, Síria, Israel, Palestina, Turquia, Egito, Jordânia, Líbia)
<i>Labneh, Laban Zerr,</i>	Egito e Sudão
<i>Torba, Süzme</i>	Turquia
<i>Stragisto, Sakoulas</i>	Grécia
<i>Syuzma</i>	Rússia
Iogurte grego ou Iogurte tipo grego	Reino Unido, Austrália, Nova Zelândia, EUA, Brasil
<i>Chakka, Shrikhand</i>	Índia
<i>Ymer, Ylette</i>	Dinamarca
<i>Skyr</i>	Islândia

Fonte: Adaptado de Tamime, Hickey e Muir (2014).

O iogurte grego pode ser elaborado através de diferentes métodos de fabricação. No método tradicional o iogurte é transferido para dessoradores os quais, em baixas temperaturas ($\leq 10\text{ }^{\circ}\text{C}$), permitem que o soro seja drenado. O tempo necessário para remoção do soro irá depender do teor de sólidos totais desejado no iogurte, mas geralmente varia de 24-48 horas (KILARA; RAMESH; CHANDAN, 2013). Em operações de maior escala, a fim de reduzir o tempo de processo, os dessoradores (contendo aproximadamente 25 kg de iogurte) são empilhados e submetidos à prensagem em prensas verticais localizadas em ambientes refrigerados (NSABIMANA; JIANG; KOSSAH, 2005; TAMIME; HICKEY; MUIR, 2014). O rendimento do iogurte concentrado através do método tradicional é afetado por fatores como o tipo de leite utilizado (o de ovelha apresenta maior rendimento, seguido pelo de cabra e de vaca), o teor de sólidos totais de base láctea, as cepas empregadas como culturas iniciadoras, a temperatura de refrigeração durante a drenagem e o pH final do produto após a fermentação (OZER, 2006). O processo tradicional de obtenção do iogurte grego, além de ser trabalhoso, resulta em rendimentos mais baixos devido à adesão do produto aos dessoradores. Em vista disso, a obtenção do produto em escala industrial emprega outros processos que facilitam sua concentração, como a centrifugação e os processos de separação por membranas (KILARA; RAMESH; CHANDAN, 2013).

Tradicionalmente, os iogurtes concentrados são produzidos através da remoção de seus componentes solúveis. No entanto, estes produtos também são comumente elaborados através da fortificação do

leite com ingredientes que os tornam mais consistentes como, por exemplo, proteínas lácteas ou outros hidrocolóides. Quando elaborado nestas condições o mais correto é referir-se ao produto como iogurte *tipo grego* (DESAI; SHEPARD; DRAKE, 2013; TAMIME; HICKEY; MUIR, 2014).

REFERÊNCIAS

ABD EL-SALAM, M. H. et al. Preparation and properties of probiotic concentrated yoghurt (labneh) fortified with conjugated linoleic acid. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, p. 2103-2110, 2011.

ALLAN-WOJTAS, P.; TRUELSTRUP HANSEN, L.; PAULSON, A. T. Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 101-108, 2008.

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

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

APOLINÁRIO, A. C. et al. Inulin-type fructans: a review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 368-378, 2014.

ARAGON-ALEGRO, L. C. et al. Probiotic and symbiotic chocolate mousse. **LWT – Food Science and Technology**, v. 40, p. 669-675, 2007.

ARSLAN, S. et al. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* with different wall materials by spray drying. **LWT- Food Science and Technology**, v. 63, p.685-690, 2015.

ATRA, R. et al. Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 325-332, 2005.

AVILA-REYES, S. V. et al. Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p.423-430, 2014.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, p. 89-97, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 24 out. 2007. n. 205, Seção 1, p. 4.

BRASIL. Embrapa Gado de Leite. **Panorama do Leite**, Ano 6, n.75, fevereiro/2013. Disponível em: http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2013_02_PanoramaLeite.pdf. Acesso em: 01 de março de 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos Com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde**. Disponível em: <http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/wuE>. Acesso em: 14 de outubro de 2015.

BAKER, R W. **Membrane Technology and Applications**. 2. ed. Chichester: John Wiley And Sons, 2004. 538 p.

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

BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; JULIANO, P. Physical and chemical properties of food powders. In: **Encapsulated and Powdered Foods**. Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis. p. 39-71, 2005.

BASSETTI, F. J. **Preparação, caracterização e aplicação de membranas poliméricas microporosas assimétricas**. 2002. 192 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

BEDANI, R. et al. Incorporation of soybean by-product okara and inulin in a probiotic soy yoghurt: texture profile and sensory acceptance. **Journal of The Science of Food And Agriculture**, v. 94, p. 119-125, 2013.

BEGLEY, M.; GAHAN, C. G. M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 625-651, 2005.

BEZERRA, M. et al. Caprine frozen yoghurt produced with fresh and spray dried jambolan fruit pulp (*Eugenia jambolana Lam*) and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BI-07. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, p.1099-1104, 2015.

BOSSCHER, D. Fructan prebiotics derived from inulin. In: CHARALAMPOPOULOS, D.; RASTALL, A (Eds.). **Probiotics and prebiotics science and technology**, New York: Springer, p. 163-205, 2009.

BOYLSTON, T. D et al. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 375-387, 2004.

BRANS, G et al. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. **Journal of Membrane Science**, v. 243, p. 263-272, 2004.

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

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

BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 467- 483, 2011.

BURNS, P. et al. Influence of dairy practices on the capacity of probiotic bacteria to overcome simulated gastric digestion. **International Journal of Dairy Technology**, v. 67, p.448-457, 2014.

BUTYLINA, S.; LUQUE, S.; NYSTRÖM, M. Fractionation of whey-derived peptides using a combination of ultrafiltration and nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 280, p. 418-426, 2006.

CARABIN, I.G.; FLAMM, W.G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 30, p. 268-282, 1999.

- CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v. 445-446, p. 385-396, 2013.
- CASAROTTI, S. N.; TODOROV, S. D.; PENNA, A. L. B. Effect of different matrices on probiotic resistance to in vitro simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Dairy Technology**, v. 68, p. 595-601, 2015.
- CASTRO, F. P. et al. Effect of oligofructose incorporation on the properties of fermented probiotic lactic beverages. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, p. 68-74, 2008.
- CASTRO-CISLAGHI, F. P. et al. *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 113, p. 186-193, 2012.
- CHARALAMPOPOULOS, D.; RASTALL, R. A. Prebiotics in foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 1-5, 2011.
- CHARCOSSET, C. Membrane processes in biotechnology: an overview. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 482-492, 2006.
- CHÁVEZ, B. E.; LEDEBOER, A. M. Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. **Drying Technology**, v. 25, p. 193-201, 2007.
- CHEN, J. P. et al. Membrane Separation: Basics and Application. In: WANG, L. K.; CHEN, J. P.; HUNG, Y. T.; SHAMMAS, N. K. (Eds.). **Membrane and Desalination Technologies, Handbook of Environmental Engineering**. Humana Press, p. 271-332, 2008.
- CHERYAN, M. **Ultrafiltration and Microfiltration Handbook**. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1998. 527p.
- COOK, M. T. et al. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 162, p. 56-67, 2012.
- CORCORAN, B. M. et al. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1024-1039, 2004.
- CORREIA, M. I. T. D.; LIBOREDO, J. C.; CONSOLI, M. L. D. The role of probiotics in gastrointestinal surgery. **Nutrition**, v. 28, p. 230-234, 2012.

COTTER, P. D.; HILL, C. Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 429-453, 2003.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, 900p.

De VOS, P. et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 292-302, 2010.

De PRISCO, A. et al. Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. **LWT - Food Science And Technology**, v. 61, p.452-462, 2015.

DEBON, J. **Emprego da microfiltração tangencial na obtenção de leite fermentado prebiótico**. 2009. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

DEL PIANO, M. et al. Is microencapsulation the future of probiotic preparations? The increased efficacy of gastro-protected probiotics. **Gut Microbes**, v. 2, 2, p.120-123, 2011.

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

DESAI, N.T.; SHEPARD, L.; DRAKE, M.A. Sensory properties and drivers of liking for Greek yogurts. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p.7454-7466, 2013.

DING, W. K.; SHAH, N. P. Acid, Bile, and Heat Tolerance of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria. **Journal of Food Science**, v. 72, p. 446-450, 2007.

DING, W. K.; SHAH, N. P. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. **Journal of Food Science**, v. 74, p. 100-107, 2009.

DOHERTY, S B. et al. Development and characterization of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1604-1617, 2011.

DZIEZAK, J. D. Membrane separation technology offers processors unlimited potential. **Food Technology**, v. 44, p. 108-113, 1990.

ESTEVINHO, B. et al. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications - a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 31, p. 138-155, 2013.

ETCHEPARE, M. A. et al. Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 511-517, 2016.

EUROMONITOR INTERNACIONAL. **Yoghurt and Sour Milk Products in Brazil**. 2015. Disponível em: <<http://www.euromonitor.com/yoghurt-and-sour-milk-products-in-brazil/report>>. Acesso em: 22 de outubro de 2015.

FANE, A. G.; WANG, R.; JIA, Y. Membrane technology: past, present and future. In: WANG, L.K.; CHEN, J.P.; HUNG, Y.T.; SHAMMAS, N.K. (Eds.). **Membrane and Desalination Technologies, Handbook of Environmental Engineering**. Humana Press, p. 1-45, 2008.

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

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation techniques for food ingredient systems. In: BHANDARI, B.; ROSS, Y.H. (Eds.). **Food Materials Science and Engineering**. Oxford: Wiley-Blackwell, p. 320-348, 2012.

FAO/WHO. **Probiotics in Food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation**. Roma: FAO Food and Nutrition, 2006. 45 p. Disponível em: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/probiotics/en/>. Acesso em 14 de outubro de 2015.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, p. 103-112, 2008.

FLOOD, M. T.; AUERBACH, M. H.; CRAIG, S. A. S. A review of the clinical toleration studies of polydextrose in food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1531-1542, 2004.

FOX, F. P. Milk proteins as food ingredients. **International Journal of Dairy Technology**, v. 54, p. 41-55, 2001.

FRITZEN-FREIRE, C. B et al. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. **Food Research International**, v. 45, p. 306-312, 2012.

FRITZEN-FREIRE, C. B. et al. Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. **LWT- Food Science and Technology** v. 50, p.39-44, 2013a.

FRITZEN-FREITE, C. B. et al. Effect of the application of *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulated by spray drying with prebiotics on the properties of ricotta cream. **Food Research International**, v. 52, p 50-55, 2013b.

GARCÍA-GARIBAY, M.; JIMÉNEZ-GUZMÁN, J.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H. Whey Proteins: bioengineering and health. In: GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. F.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; WELTI-CHANES, J.; PARADA-ARIAS, E. (Eds.). **Food Engineering: Integrated Approaches, Food Engineering Series**. New York: Springer, p. 415-430, 2008.

GBASSI, G. K. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 103-105, 2009.

GBASSI, G. K. et al. In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 97-102, 2011.

GEBARA, C. et al. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 51, p. 872-878, 2013.

GEREZ, C. L. et al. Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 to low pH. **Letters in Applied Microbiology**, v. 54, p. 552-556, 2012.

GHANDI, A. et al. Effect of shear rate and oxygen stresses on the survival of *Lactococcus lactis* during the atomization and drying stages of spray drying: a laboratory and pilot scale study. **Journal of Food Engineering**, v. 113, p. 194-200, 2012.

GHARSALLAOUI, A. et al. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview **Food Research International**, v. 40, p. 1107-1121, 2007.

- GIBSON, G. R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Review**, v. 17, p. 259-275, 2004.
- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.
- GLIBOWSKI, P.; PIKUS, S. Amorphous and crystal inulin behavior in a water environment. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 635-639, 2011.
- GOLOWCZYCA, A. M. et al. Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 556-560, 2011.
- GUERRA, A. et al. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. **Trends in Biotechnology**, v. 30, p.591-600, 2012.
- HABERT, A. C; BORGES, C. P.; NÓBREGA, R. **Processos de Separação com Membranas**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2006. 180p.
- HAELSSIG, J. B. et al. Membrane Dephlegmation: a hybrid membrane separation process for efficient ethanol recovery. **Journal of Membrane Science**, v. 381, p. 226-236, 2011.
- HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. **Journal of Food Engineering**, v. 98, p. 309-316, 2010.
- HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, p. 291-311, 2012.
- HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, L. et al. *Lactobacillus plantarum* protection by entrapment in whey protein isolate: k-carrageenan complex coacervates. **Food Hydrocolloids**, v. 36, 181-188, 2014.
- HUANG, Y.; ADAMS, M. C. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 253-260, 2004.

IONASHIRO, M. **Giolito: Fundamentos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial/ Calorimetria Exploratória Diferencial**, São Paulo: Giz editorial, 2004.

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

JOST, R. Milk and Dairy Products. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, p. 316-371, 2007.

JUNGERSEN, M. et al. The Science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12[®]. **Microorganisms**, v. 2, p. 92-110, 2014.

KAILASAPATHY, K. Microencapsulation for Gastrointestinal Delivery of Probiotic Bacteria. In: Kwak. H.-S. (Ed.). **Nano- And Microencapsulation For Foods**. Chichester: John Wiley & Sons, p.167-197, 2014.

KARIMI, R. et al. Application of inulin in cheese as prebiotic, fat replacer and texturizer: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 119, p. 85-100, 2015.

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

KHEM, S.; SMALL, D. M.; MAY, B. K. The behaviour of whey protein isolate in protecting *Lactobacillus plantarum*. **Food Chemistry**, v. 190, p.717-723, 2016.

KILARA, A.; CHANDAN, R. C. Greek-style yogurt and related products. In: CHANDAN, R. C.; KILARA, A. (Eds.). **Manufacturing Yogurt And Fermented Milks**. Oxford: John Wiley & Sons, p.297-318, 2013.

KOBLITZ, M. G. B. **Matérias-primas alimentícias: composição e controle de qualidade**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 301 p.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de

alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 329-347, 2008.

KONDEPUDI, K. K. et al. Prebiotic-non-digestible oligosaccharides preference of probiotic bifidobacteria and antimicrobial activity against *Clostridium difficile*. **Anaerobe**, v. 18, p. 489-497, 2012.

KOSSEVA, M.R. et al. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, p. 437-447, 2009.

KRASAEKOOPT, W.; WATCHARAPOKA, S. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, p.761-766, 2014.

KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Effect of carrier agents on the physicochemical properties of a spray dried chicken meat protein hydrolysate. **Journal of Food Engineering**, v. 94, p. 326-333, 2009.

LI, S. et al. *Lactobacillus casei* immobilized onto montmorillonite: Survivability in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration and yogurt. **Food Research International**, v. 64, p. 822-830, 2014.

LIU, Z. et al. Screening of bifidobacteria with acquired tolerance to human gastrointestinal tract. **Anaerobe**, v. 13, p. 215-219, 2007.

LOMAX, A.; CALDER, P.C. Prebiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence. **British Journal of Nutrition**, v. 101, p. 633-658, 2009.

LÓPEZ-RUBIO, A. et al. Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living bifidobacteria in food hydrocolloids. **Food Hydrocolloids**, v. 28, p. 159-167, 2012.

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

MA, J. et al. Organic matter recovery from municipal wastewater by using dynamic membrane separation process. **Chemical Engineering Journal**, v. 219, p. 190-199, 2013.

MACIEL, G. M. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p.1991-1998, 2014.

MADUREIRA, A. R. et al. Bovine whey proteins – overview on their main biological properties. **Food Research International**, v. 40, p. 1197-1211, 2007.

MADUREIRA, A. R. et al. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, p.465-470, 2011.

MAKINEN, K. et al. Science and technology for the mastership of probiotic applications in food product. **Journal of Biotechnology**, v. 162, p. 356-365, 2012.

MARTÍN, M. J. 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.

MEIRA, Q. G. S. et al. Effects of added *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* probiotics on the quality characteristics of goat ricotta and their survival under simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 76, p. 828-838, 2015.

MENG, X. C. et al. Anhydrobiotics: the challenges of drying probiotic cultures. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1406-1416, 2008.

MEYER, D. et al. Inulin as texture modifier in dairy products. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1881-1890, 2011.

MOHAMMADI, R.; SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A. M. The starter culture characteristics of probiotic microorganisms in fermented milks. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, p.399-409, 2012.

MOLLEA, C., MARMO, L., BOSCO, F. Valorisation of cheese whey, a by-product from the dairy industry. In: MAZZALUPO, I. (Ed.). **Food Industry**. InTech. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/food-industry/valorisation-of-cheese-whey-a-by-product-from-the-dairy-industry>. Acesso em: 07 de outubro de 2015.

MOUSA, A. et al. Evaluation of physiochemical, textural, microbiological and sensory characteristics in set yogurt reinforced by

microencapsulated *Bifidobacterium bifidum* F-35. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, p.1673-1679, 2014.

MULDER, M. **Basic principles of membrane technology**. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 1996. 564 p.

MURAKAMI, A. N. N. et al. Concentration of biologically active compounds extracted from *Ilex paraguariensis* St. Hil. by nanofiltration, **Food Chemistry**, v. 141, p. 60-65, 2013.

MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 587-597, 2007.

NAG, A.; HAN, K.; SING, H. Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodium caseinate and gellan gum. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 247-253, 2011.

NAZZARO, F. et al. Microencapsulation in food science and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 182-186, 2012.

NG, E.W; YEUNG, M.; TONG, P.S. Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 169-175, 2011.

NOZIÈRE, P. et al. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. **Animal Feed Science and Technology**, v. 131, p. 418-450, 2006.

NSABIMANA, C.; JIANG, B.; KOSSAH, R. Manufacturing, properties and shelf life of labneh: a review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 58, p.129-137, 2005.

OECD/FAO. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2015-2024**. Paris: OECD Publishing, 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-en. Acesso em: 07 de outubro de 2015.

O'HAGAN, P. et al. Particle size analysis of food powders. In: **Encapsulated and Powdered Foods**. Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis. p. 215-245, 2005.

OKURO, P. K. et al. Co-encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides

protection and improves stability. **Food Research International**, v. 53, p. 96-103, 2013.

OLIVEIRA, M. E. G. et al. Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 241-247, 2014.

OLIVEIRA, M. N. **Tecnologia de produtos lácteos funcionais**. São Paulo: Atheneu, 2009. 384 p.

OLIVEIRA, R. P. S. et al. Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 467-472, 2009.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnología de alimentos Vol 1: Componentes dos Alimentos e processos**. Porto Alegre: Artmed, 2005a. 294 p.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnología de alimentos Vol 2: Alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005b. 279 p.

OZER, B. Production of concentrated products. In: TAMIME, A. Y. (Ed.). **Fermented Milks**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, p. 128 – 155, 2006.

PERRONE, I. T.; PEREIRA, J. P. F.; CARVALHO, A. F. Aspectos tecnológicos da fabricação e soro em pó: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, p. 23-30, 2011.

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

PINTO, S. S. et al. Effects of the addition of microencapsulated *Bifidobacterium* BB-12 on the properties of frozen yogurt. **Journal of Food Engineering**, v. 111, p. 563-569, 2012.

PIZZILLO, M. et al. Effect of goat breed on the sensory, chemical and nutritional characteristics of ricotta cheese. **Livestock Production Science** v. 94, p. 33-40, 2005.

PLESSAS, S. et al. Potential effects of probiotics in cheese and yogurt production: A review. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, p. 433-440, 2012.

- PRASANNA, P. H. P.; GRANDISON, A. S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Bifidobacteria in milk products: An overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits. **Food Research International**, v. 55, p.247-262, 2014.
- PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48-68, 2012.
- RAIKOS, V. Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. A review. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 259-265, 2010.
- RAJAM, R. et al. Effect of whey protein – alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, v. 4, p. 891-898, 2012.
- RAJAM, R.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p.773-780, 2015.
- RANADHEERA, C. S. et al. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, v. 49, p. 619-625, 2012.
- RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, p. 1-7, 2010.
- RANINEN, K et al. Dietary fiber type reflects physiological functionality: comparison of grain fiber, inulin, and povidextrose. **Nutrition Reviews**, v. 69, p. 9-21, 2011.
- RATHORE, S. et al. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 369-381, 2013.
- RIBEIRO, M. C. E. et al. Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. **Food Research International**, v. 66, p. 424-431, 2014.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v. 27, p. 1-11, 2010.

ROBERFROID, M. B. Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 2493-2502, 2007.

RODRIGUES, D. et al. Influence of L-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. **International Dairy Journal**, v. 21, p.869-876, 2011.

RODRÍGUEZ-HUEZO, M. E. et al. Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. **Food Research International**, v. 40, p. 1299-1306, 2007.

RODRÍGUEZ-HUEZO, M. E. et al. Viability of *Lactobacillus plantarum* entrapped in double emulsion during Oaxaca cheese manufacture, melting and simulated intestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p.768-773, 2014.

ROLIM, F. R. L. et al. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 807-813, 2015.

ROMÁN, A. et al. Experimental investigation of the sweet whey concentration by nanofiltration. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 702-709, 2011.

ROSENBERG, M. Current and future applications for membrane process in the dairy industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 12-19, 1995.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I.J.; TALMON, Y. A scanning electron microscopy study of microencapsulation. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 139-144, 1985.

RUSSELL, D. A. et al. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, 88-105, 2011.

SAAD, N. et al. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 1-16, 2013.

SABIKHI, L. et al. Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p. 586-593, 2010.

SAXENA, A. et al. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: an overview. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, p. 1–22, 2009.

SATHYABAMA, S. et al. Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment. **LWT - Food Science And Technology**, v. 57, p.419-425, 2014.

SCHÖNFELDT, H. C.; HALL, N. G.; SMIT, L. E. The need for country specific composition data on milk. **Food Research International**, v. 47, p. 207-209, 2012.

SEMYONOV, D. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. **Food Research International**, v. 43, p. 193-202, 2010.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Editora-Livraria Varela, 1996. 517 p.

SGARBIERI, V. C.; Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 8, p. 43-56, 2005.

SHABALA, L et al. *Listeria innocua* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* employ different strategies to cope with acid stress. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, p.1-7, 2006.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1262-1277, 2007.

SHOJI, A.S. et al. Viability of *L. acidophilus* microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. **Food and Bioprocess Processing**, v. 91, p.83-88, 2013.

SILVA, J. C. **Desenvolvimento de processo integrado utilizando processos de separação por membrana e adsorção em carvão ativado para o tratamento de água associada à produção de petróleo**. 2010. 142 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química).

- Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- SINHA, R. et al. Whey protein hydrolysate: functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1484-1491, 2007.
- SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 1-11, 1996.
- SMITHERS, G.W. Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 695-704, 2008.
- STOWELL, J. D. Prebiotic potential of polydextrose. In: CHARALAMPOPOULOS D.; RASTALL, A (Eds.). **Probiotics and prebiotics science and technology**. New York: Springer, p. 347-352, 2009.
- TAMIME, A.; HICKEY, M.; MUIR, D. Strained fermented milks – A review of existing legislative provisions, survey of nutritional labelling of commercial products in selected markets and terminology of products in some selected countries. **International Journal of Dairy Technology**, v. 67, 2014.
- TONON, R. V. et al. Physicochemical and morphological characterisation of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p.1950-1958, 2009.
- TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 225-241, 2014.
- TRABELSI, I. et al. Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved the survival of newly probiotic in oxgall and gastric juice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 61, p. 36–42, 2013.
- VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 714-728, 2008.
- VERRUCK, S. et al. Influence of *Bifidobacterium* Bb-12 on the physicochemical and rheological properties of buffalo Minas Frescal cheese during cold storage. **Journal of Food Engineering**, v. 151, p.34-42, 2015.

- WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Dairy Chemistry and Physics**. New York: John Wiley and Sons, 1984.
- WANG, Y. Prebiotics: Present and future in food science and technology. **Food Research International**, v. 42, p. 8-12, 2009.
- WEICHSELBAUM, E. Probiotics and health: a review of the evidence. **Nutrition Bulletin**, v. 34, p. 340-373, 2009.
- WERHAN, H.; FARSHORI, A.; ROHR, P. R. V. Separation of lignin oxidation products by organic solvent nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 423-424, p. 404-412, 2012.
- WICHCHUKIT, S. et al. Whey protein/alginate beads as carriers of a bioactive component. **Food Hydrocolloids**, v. 33, p. 66-73, 2013.
- YADAV, J.S.S. et al. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 756-774, 2015.
- YING, D. Y. et al. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG powders: relationship of powder physical properties to probiotic survival during storage. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 588-595, 2010.
- YING, D. Y. et al. Enhanced survival of spray-dried microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in the presence of glucose. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 597-602, 2012.
- YONEKURA, L. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 205-214, 2014.
- ZHANG, T. C. et al. **Membrane Technology and Environment Applications**. Virginia: American Society of Civil Engineers, 2012. 742 p.

CAPÍTULO 2 - POTENCIAL DA UTILIZAÇÃO DE SORO DE LEITE CONCENTRADO E PREBIÓTICOS COMO AGENTES ENCAPSULANTES NA PROTEÇÃO DE *BIFIDOBACTERIUM* BB-12 MICROENCAPSULADA POR *SPRAY DRYING*

Artigo publicado:

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

RESUMO

O micro-organismo probiótico *Bifidobacterium* BB-12 foi microencapsulado por *spray drying* utilizando soro de leite líquido ou retentado obtido por nanofiltração, bem como inulina e polidextrose como agentes encapsulantes. As microcápsulas obtidas foram caracterizadas e a viabilidade da bifidobactéria foi determinada durante 90 dias de armazenamento a 4 °C e a - 20 °C. Todas as microcápsulas apresentaram alta contagem de bifidobactéria, baixo teor de umidade e baixa atividade de água. As microcápsulas apresentaram morfologias e tamanhos de partículas similares. A densidade das microcápsulas diminuiu com o aumento no teor de sólidos totais da solução de alimentação. Os maiores valores de higroscopicidade foram observados nas microcápsulas produzidas com polidextrose. O tempo de dissolução em água foi maior do que em óleo para todas as amostras. A presença dos prebióticos nas microcápsulas aumentou os valores de L* e reduziu os valores de b*; enquanto que as amostras produzidas com retentado do soro de leite apresentaram menores valores de a*. Os resultados das análises térmicas sugeriram que a presença dos prebióticos melhorou a estabilidade das microcápsulas.

Palavras-chave: Microencapsulação. *Spray drying*. *Bifidobacterium* BB-12. Soro de leite. Inulina. Polidextrose.

Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulated by spray drying

ABSTRACT

Bifidobacterium BB-12 was microencapsulated by spray drying using liquid whey or whey retentate obtained from nanofiltration and inulin or polydextrose. The microcapsules were then characterized and the viability of the bifidobacteria was determined for 90 days at 4°C and at -20°C. All the microcapsules showed high count of bifidobacteria, low moisture content, and low water activity. The microcapsules showed similar morphologies and particle sizes. The density of the microcapsules decreased with the increase of the total solids of the feed solutions. The highest hygroscopicity was noted in the microcapsules produced with polydextrose. The time of dissolution in water was longer than it was in oil for all the samples. The presence of prebiotics in the microcapsules increased the L* values and decreased the b* values; meanwhile, the samples produced with whey retentate showed lower a* values. The results of the thermal analysis suggested that prebiotics improved the stability of the microcapsules.

Keywords: Microencapsulation. Spray drying. *Bifidobacterium* BB-12. Whey. Inulin. Polydextrose.

1.INTRODUCTION

Bifidobacteria are regarded as one of the most important groups of probiotic bacteria and have mainly been incorporated into fermented foods and dairy products. Nevertheless, several factors have been reported to affect the viability of probiotic bifidobacteria in dairy products, such as titratable acidity, pH, hydrogen peroxide, dissolved oxygen content, and storage time and temperature (PRASANNA; GRANDISON; CHARALAMPOPOULOS, 2014). Thus, a major challenge faced when developing a probiotic food product is to ensure a high survival rate of the bacteria during the manufacture of the product and also throughout its shelf life so that these bacteria are delivered in sufficient numbers to confer the expected health benefits (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Within this context, microencapsulation of probiotic cells has been widely studied as a method to improve the stability of these microorganisms by protecting them from adverse environments

(HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2010; MACIEL et al., 2014; TRIPATHI; GIRI, 2014). Spray drying is commonly used for microencapsulation of probiotic bacteria because it features some advantages, such as relatively low cost, ease of operation, and ability to scale up to large throughput (GHANDI et al., 2012). The survival rate of probiotics after spray drying and subsequent storage depends upon a number of factors, such as the species and strain of the culture, outlet temperatures, and the incorporation of appropriate carrier agents into the drying medium (LIAN; HSIAO; CHOU, 2002). Regarding the encapsulation matrices, polysaccharides, proteins, and combinations thereof have raised considerable interest in their use as carrier agents for microencapsulation of probiotics. Among the polysaccharides, those with prebiotic properties, such as inulin and polydextrose, have been used to protect probiotic bacteria during spray drying and under storage conditions (AVILA-REYES et al., 2014; CORCORAN et al., 2004; FRITZEN-FREIRE et al., 2012). Inulin is a linear polysaccharide with a degree of polymerization (DP) that ranges from 10 to 60. It is composed of β (2-1) linked fructose residues mostly ending with a glucose residue and is commercially extracted from chicory roots (ROBERFROID, 2007). Polydextrose is a synthetic polysaccharide with low molecular weight, composed of randomly bonded glucose with an average DP of 12 (STOWELL, 2009).

Proteins' excellent functional properties and high nutritional value allow them to be a good carrier agent for microencapsulation (DOHERTY et al., 2011). Particularly, whey proteins have been widely studied for encapsulation of probiotics (DUONGTHINGOC et al., 2013; RAJAM et al., 2012). However, most of these studies have used whey proteins in the form of whey protein concentrate (WPC) and whey protein isolate (WPI).

Whey is a by-product of relative importance in the dairy industry because it is produced in large quantities and also because of its nutritional composition, which is mainly of lactose and soluble proteins. Although whey has a high nutritional value and is suitable for several applications in the food and pharmaceutical industries, it is often treated as a dairy wastewater, which causes serious environmental problems due to its high biological ($27 - 60 \text{ g L}^{-1}$) and chemical demands for oxygen ($50 - 102 \text{ g L}^{-1}$) (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011; CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013). Therefore, the possibility of using liquid whey, which is a low-cost and easily available by-product, as a probiotic carrier agent could be an interesting alternative for its

utilization, and thus help to reduce the amount of whey discarded as waste.

Castro-Cislaghi et al. (2012) used whey in its liquid form as carrier agent for spray dried *Bifidobacterium* BB-12. In addition, Pimentel-González et al. (2009) used liquid whey concentrated by evaporation as an emulsifier for microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* by the emulsification method. However, to date, there are no reports in literature regarding studies where whey retentate obtained from nanofiltration in combination with prebiotic agents were employed as carrier agent for microencapsulation of probiotics by spray drying. Thus, the aim of this study was to investigate the potential of whey retentate obtained from nanofiltration, in comparison to non-concentrated whey, and prebiotics (inulin and polydextrose) as carrier agents for microencapsulation of *Bifidobacterium* BB-12. For this purpose, the microcapsules were characterized in relation to their physical characteristics on the day of their manufacture, and the viability of microencapsulated bifidobacteria was observed during storage for 90 days at 4 °C and at – 20 °C.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Manufacture of the liquid whey and whey retentate

The liquid whey was obtained by enzymatic coagulation of commercial pasteurized milk (3 g fat 100 mL⁻¹) through addition of commercial rennet (*Aspergillus niger* var. *awamori*, Ha La[®], Chr. Hansen, Valinhos, Brazil) (0.9 mL L⁻¹) and subsequent incubation at 37 ± 1 °C for 50 min. The whey was collected after breakage and draining of the curd. Part of the whey was concentrated by nanofiltration (NF) using a tangential flow filtration pilot plant equipped with a polyvinylidene difluoride filter in the spiral configuration with molecular weight cut-off ranging between 150 and 300 g mol⁻¹ and effective filter area of 1.2 m² (GE Osmonics[®], Philadelphia, USA). The operating parameters controlled during the process were temperature of 35 ± 2 °C and pressure of 0.7 MPa until reaching a Volume Reduction Factor (VRF) of 2. The VRF was calculated as the ratio between the initial feed volume (L) and the volume of the remaining retentate (L). During nanofiltration, the average permeate flux (J) obtained was of 4.62 L h⁻¹ m². The whey and the retentate obtained from NF were heat treated at 64 ± 1 °C for 30 min, placed in plastic bags, frozen in a plate freezer (Frigostrella, Cotia, São Paulo, Brazil) at -40 °C, and stored at -

20 ± 1 °C. The total solids and protein content (AOAC, 2005) of liquid whey and whey retentate were 6.51 ± 0.02 g 100g⁻¹ and 0.77 ± 0.01 g 100g⁻¹; and 10.05 ± 0.01 g 100g⁻¹ and 1.77 ± 0.02 g 100g⁻¹, respectively.

The complete physicochemical characterization of liquid whey and whey retentate is shown in Table 5.1 (APÊNDICE A).

2.2 Preparation of the bacterial suspension

The bacterial suspension was prepared following the procedures described by Fritzen-Freire et al. (2012). Twenty-five grams of freeze-dried probiotic cells of *Bifidobacterium* BB-12 (BB-12[®], Chr. Hansen, Hønsholm, Denmark) were rehydrated in 1 L of a solution of reconstituted skim milk (Molico[®], Nestlé, São Paulo, Brazil) (120 g L⁻¹) and frozen as stock solution at -20 ± 1 °C in sterile glass bottles. The final count of *Bifidobacterium* BB-12 in the stock solution was 11.65 ± 0.03 log CFU/mL. Before spray drying, this stock solution was incubated at 37 °C for 2 hours.

2.3 Microencapsulation by spray drying

2.3.1. Preparation of the drying media

The carrier agents used for preparation of feed solutions were liquid whey or whey retentate and the prebiotics inulin (Orafti[®] HPX, Orafti, Tienen, Belgium) with degree of polymerization (DP) ≥ 23, and polydextrose (STA-LITE[®] III, Tate & Lyle, Decatur, IL, USA) with DP ranging from 10 to 12. The composition and total solids content (AOAC, 2005) of feed solutions used for the production of *Bifidobacterium* BB-12 spray dried microcapsules are given in Table 2.1. All the feed solutions were homogenised and heat treated at 80 °C for 30 min. The feed solutions were then cooled to room temperature and 50 mL L⁻¹ of bacterial suspension was added. The entire process for the production of the probiotic powders was performed in triplicate, and the analyses were performed using samples from all the batches.

2.3.2 Spray drying

The microcapsules were obtained with a laboratory scale spray dryer (B-290 mini spray dryer, Buchi, Flawil, Switzerland), operating at constant air inlet temperature of 150 °C and outlet temperature at 50 ± 3 °C. The feed solutions containing *Bifidobacterium* BB-12 were kept

under stirring at room temperature and fed into the main chamber through a peristaltic pump, with a feed flow of 6 mL min^{-1} , drying air flow rate of $35 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ and compressor air pressure of 0.7 MPa . The dried powder samples were collected from the base of the cyclone and thoroughly mixed with a spatula. The samples were placed in sterile plastic vials and stored at $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ and $-20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ without relative humidity (RH) control, i.e., under conditions mimicking regular storage in a domestic refrigerator and freezer.

Table 2.1: Composition and total solids content of feed solutions.

Carrier agents formulation	Carrier agent ratio (w/v)	Liquid whey (mL)	Whey retentate (mL)	Inulin (g)	Polydextrose (g)	<i>Bifidobacterium</i> BB-12 suspension (mL)	Total solids contents (g 100 g ⁻¹)
W1	-	1000	-	-	-	50	6.52 ± 0.06 ^e
W2	1:10	1000	-	100	-	50	13.84 ± 0.38 ^c
W3	1:10	1000	-	-	100	50	14.30 ± 0.14 ^c
WR1	-	-	1000	-	-	50	10.50 ± 0.07 ^d
WR2	1:10	-	1000	100	-	50	16.58 ± 0.45 ^b
WR3	1:10	-	1000	-	100	50	17.78 ± 0.02 ^a

^{a-e} Means ± standard deviation with different superscript letters in the same column indicate significant differences (P < 0.05).

2.4 Viability of the microencapsulated bifidobacteria during storage time

The viable cell counts of the microcapsules were determined on the day when the different powders were manufactured and during their storage for 90 days at 4 ± 1 °C and at -20 ± 1 °C. Before the enumeration of the bifidobacteria, the entrapped bacteria were released from the microcapsules according to the methodology proposed by Sheu, Marshall, and Heymann (1993). One gram of the microcapsules was re-suspended in 9 mL of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) followed by homogenization using a magnetic stirrer for 10 min. The bifidobacteria were enumerated by the pour plate method on MRS agar (Difco, Sparks, USA) modified with the addition of $0.2 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ lithium chloride (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) and $0.3 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ sodium propionate (Fluka, Neu-Ulm, Germany), as proposed by Vinderola and Reinheimer (1999). The plates were incubated in anaerobic jars containing AnaeroGen[®] (Oxoid, Hampshire, UK) at 37 ± 1 °C for 72 h. The count of viable probiotic cells was expressed as log colony-forming units per gram ($\log \text{ CFU g}^{-1}$).

2.5 Characterization of the microcapsules

2.5.1 Morphology and particle size

The morphology and particle size of the microcapsules were observed with a Jeol scanning electron microscope, model JSM 6390 LV (Jeol, Tokyo, Japan), at an accelerating voltage of 10 kV. Before using the scanning electron microscope, the samples were coated with gold with a vacuum sputtering coater (Leica, model EM SCD 500, Welzlar, Germany), as described by Lian, Hsiao and Chou, (2002). The diameter of the microcapsules was measured from the SEM micrographs in their original magnification using ImageJ (version 1.47; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The diameter of 300 particles from each of the different formulations of microcapsules was measured (FRITZEN-FREIRE et al., 2012).

2.5.2 Moisture and water activity

The moisture content of the microcapsules was determined gravimetrically by oven drying at 102 °C until reaching constant weight,

in accordance with the International Dairy Federation (IDF, 1993). Water activity was measured at 25 °C using an Aqualab 4TE analyzer (Decagon Devices, USA) after the samples had been stabilized for 15 min.

2.5.3 Helium pycnometry

The density of the microcapsules was analyzed by helium pycnometry (AccuPycII1340, Micromeritics, Aachen, Germany), as proposed by Littringer et al. (2013) with modifications. The powder samples were dried in an oven at 60 °C for 12 h and were then let to cool down to room temperature in a desiccator prior to measurements. The weight of the samples analyzed was between 3.2 g and 4.5 g and the measurements were carried out at room temperature (22 ± 1 °C).

2.5.4 Hygroscopicity

The hygroscopicity measurements were carried out according to the method proposed by Cai and Corke (2000), with modifications. The samples of dried powder (about 1 g) were placed in a desiccator with sodium chloride saturated solution (75.3% RH) at 25 °C. After one week, the samples were weighed and their hygroscopicity was expressed as g of water absorbed per 100 g of dry solids ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$).

2.5.5 Dissolution time

The dissolution time was determined according the procedures described by Fávoro-Trindade et al. (2010) with modifications. One gram of the dried powder sample was added to 25 mL of distilled water or soybean oil, and the mixture was agitated in a 50 mL low form glass beaker with a magnetic stirrer (Dist, model DI 03, Florianópolis, Brazil) at 892 rpm and a stirring bar measuring 3 mm x 6 mm. The time required for the powders to completely dissolve was then recorded.

2.5.6 Color analysis

The color analysis was performed with a Minolta Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta, Osaka, Japan) colorimeter, adjusted to operate with D65 lightning and 10° of observation angle. The CIELab color scale was used to measure the L*, a* and b* parameters. The L* parameter ranges from 0 to 100, indicating the color variation from

black to white; the a* axis shows the variation from red (+) to green (-); while the b* axis shows the variation from yellow (+) to blue (-).

2.5.7 Differential scanning calorimetry (DSC)

The DSC curves of the microcapsules and raw materials (previously spray dried) were obtained using a Shimadzu DSC-60 cell (Shimadzu, Kyoto, Japan). Approximately 3 mg of microcapsules were placed in aluminum sealed pans, under a dynamic synthetic air atmosphere of 50 mL min⁻¹ and heated from 30 °C to 300 °C, with a heating rate of 10 °C min⁻¹. The DSC device was preliminarily calibrated with a standard reference of indium.

2.5.8 Thermogravimetric analysis (TG/DTG)

Thermogravimetry/derivative thermogravimetry (TG/DTG) measurement curves were performed using a DTG-60 thermobalance (Shimadzu, Kyoto, Japan). Approximately 6 mg of microcapsules were placed in aluminum pans and heated from 30 to 350 °C at a rate of 10 °C min⁻¹, under a dynamic synthetic air atmosphere (50 mL min⁻¹). The equipment was preliminarily calibrated with a standard reference of calcium oxalate.

2.6 Statistical analysis

The data analysis was carried out with the STATISTICA 7.0 software (StatSoft Inc., Tulsa, USA). The data was normal distributed and had equal variance. Therefore, analysis of variance (ANOVA) was applied to determine significant differences ($P < 0.05$) between samples and Tukey's test was used to compare means values. All the experiments were performed in triplicate, except those for morphology, particle size and thermal analysis.

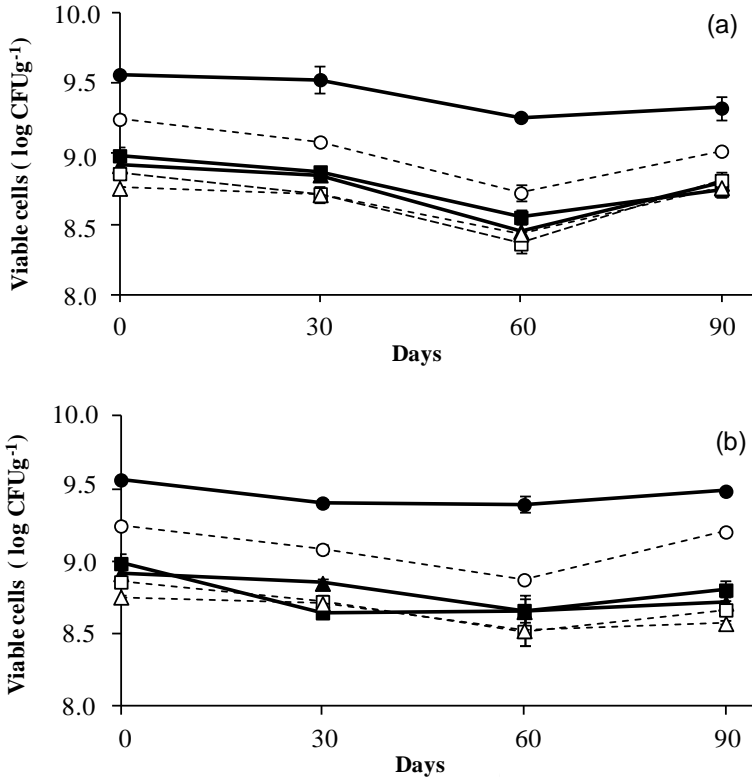
3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Viability of microencapsulated bifidobacteria during storage time

The viability of *Bifidobacterium* BB-12 microcapsules during storage at 4 °C and at -20 °C is shown in Fig. 2.1 (a) and (b), respectively. After spray drying, the initial counts of microcapsules W1

and WR1 were higher ($P < 0.05$) than those produced with prebiotics; this is probably related to the smaller total solid content of the feed solutions. The counts of bifidobacteria showed a similar pattern between each of the different microcapsules stored for 90 days at both of the temperatures studied. All the microcapsules showed a count of bifidobacteria above $6 \log \text{CFU g}^{-1}$, which is the threshold value recommended for a food to exert its probiotic benefits (TRIPATHI; GIRI, 2014). Regarding the use of liquid whey or whey retentate as carrier agent, no effects on the viability of the bifidobacteria were observed. In addition, the presence of inulin or polydextrose in the microcapsules did not affect the probiotic's viability during the storage period. Even though certain variations in the bifidobacteria populations were observed, e.g., after 60 days of storage, these changes were of little microbiological significance since they were always below $0.5 \log \text{CFU g}^{-1}$. Similar results were noted by Corcoran et al. (2004), who verified that the inclusion of the prebiotics inulin or polydextrose in the feed solutions did not result in an increase of *L. rhamnosus GG* viability during storage of the microcapsules. On the other hand, a number of studies have shown that the use of prebiotics as encapsulating agent is very promising in terms of maintenance of suitable probiotic viability during storage. Fritzen-Freire et al. (2012) noted that a partial replacement of reconstituted skim milk with oligofructose-enriched inulin rendered better protection of *Bifidobacteria* BB-12 microcapsules stored for 180 days at 4 and - 18 °C. Moreover, Okuro et al. (2013) noted that the presence of polydextrose or inulin increased cell viability of *Lactobacillus acidophilus* in solid lipid microparticles compared with samples with no prebiotics during storage under refrigeration or freezing conditions.

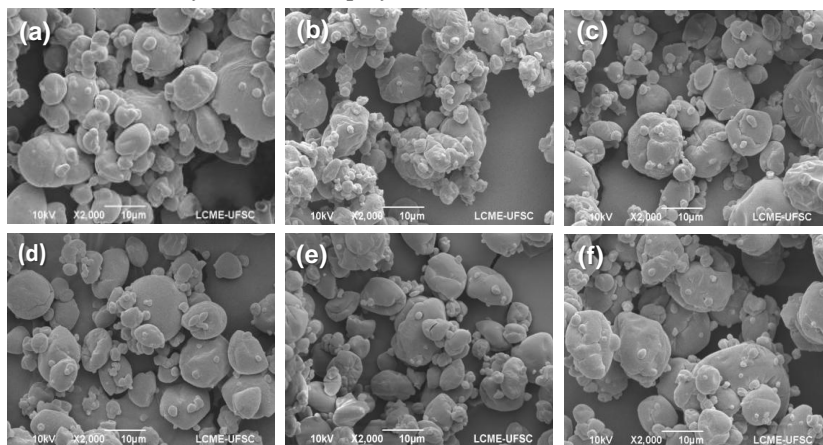
Figure 2.1: Viability of *Bifidobacterium* BB-12 microcapsules during storage time, at 4 °C (a) and - 20 °C (b). W1: microcapsules with liquid whey (●); W2: microcapsules with liquid whey and inulin (■); W3: microcapsules with liquid whey and polydextrose (▲); WR1: microcapsules with whey retentate (○); WR2: microcapsules with whey retentate and inulin (□); WR3: microcapsules with whey retentate and polydextrose (△).



3.2 Characterization of the microcapsules

Fig. 2.2 shows the SEM micrographs of the microcapsules of *Bifidobacterium* BB-12 produced with different carrier agents. Regardless of the use of liquid whey or whey retentate and the type of prebiotic agent, all the microcapsules showed similar morphologies. It was possible to note that the bifidobacteria cells were not visible outside or on the surface, confirming the formation of microcapsules for all the carrier agents used.

Figure 2.2: SEM images of microcapsules of *Bifidobacterium* BB-12 produced with: (a) liquid whey (W1), (b) liquid whey and inulin (W2), (c) liquid whey and polydextrose (W3), (d) whey retentate (WR1), (e) whey retentate and inulin (WR2) and (f) whey retentate and polydextrose (WR3).

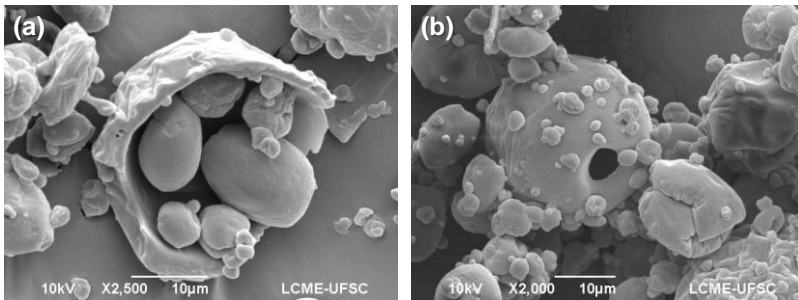


Most of the particles were of different sizes and showed a spherical shape and some concavities, which are typical characteristics of spray dried products. A similar morphology was noted by Fritzen-Freire et al. (2012) in microcapsules of *Bifidobacterium* BB-12 spray dried with reconstituted skim milk and prebiotics, and also by Maciel et al. (2014) in microcapsules of *Lactobacillus acidophilus* La-5 spray dried with reconstituted sweet whey. Teixeira et al. (2004) reported that concavities are probably formed by shrinkage of the particles during the early stages of the drying process. Furthermore, the external surface of the microcapsules showed a shrunk and wrinkled appearance and contained some cracks. According to Ré (1998), surface imperfections, such as wrinkles or cracks, occur when there is slow film formation during the drying of the atomized droplets. However, Lian, Hsiao and Chou (2002) reported that cracks may facilitate the escape of heat from inside the particle after drying, causing less heat damage to the entrapped microorganisms. Moreover, these authors suggested that this may be one of the reasons that contributed to the higher survival of the bifidobacteria after spray-drying with skim milk.

Fig. 2.3 shows the SEM micrographs of fragmented microcapsules where it is possible to note several small capsules inside a large one (Fig. 2.3a) and an apparently hollow structure (Fig. 2.3b). It is noteworthy that this behavior was observed in all the microcapsules (data not shown). According to Rosenberg, Kopelman, and Talmon

(1985) void formation in microcapsules may be related to several mechanisms connected to the atomization and drying processes, such as: desorption of dissolved gases from the solution during drying and subsequent expansion; formation of a steam bubble within the drying droplet; or incorporation of air into the liquid drop during atomization. A hollow structure in the microcapsules was also observed by Rajam et al. (2012) in spray-dried microcapsules of *Lactobacillus plantarum* produced with whey protein isolate and sodium alginate.

Figure 2.3: SEM micrographs of fragmented microcapsules of *Bifidobacterium* BB-12 produced with: (a) whey retentate and inulin (WR2) and (b) whey retentate and polydextrose (WR3).



The size of the microcapsules ranged between 10.55 and 12.77 μm (Table 2.2). Such values are within the range expected for microcapsules obtained through spray drying, which, according to Fang and Bhandari (2010), may vary from 10 to 100 μm . Moreover, as reported by Duongthingoc et al. (2013), an average population size below 40 μm in spray dried particles is expected to provide acceptable mouthfeel in food formulations. Particles with similar size (11.2 μm) were obtained by Castro-Cislaghi et al. (2012) in microcapsules of *Bifidobacterium* BB-12 using liquid whey as encapsulating agent.

Table 2.2: Characteristics of microcapsules of *Bifidobacterium* BB-12 prepared with liquid whey, whey retentate obtained from nanofiltration (NF) and prebiotics.

	Microcapsules					
	W1	W2	W3	WR1	WR2	WR3
Particles size (μm)	$10.55 \pm 2.99^{\text{b}}$	$10.77 \pm 2.93^{\text{b}}$	$12.58 \pm 3.79^{\text{a}}$	$11.23 \pm 3.21^{\text{b}}$	$12.16 \pm 3.61^{\text{a}}$	$12.77 \pm 3.89^{\text{a}}$
Moisture ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$)	$3.21 \pm 0.25^{\text{ab}}$	$2.77 \pm 0.12^{\text{b}}$	$3.55 \pm 0.29^{\text{a}}$	$2.68 \pm 0.35^{\text{b}}$	$2.67 \pm 0.30^{\text{b}}$	$2.80 \pm 0.21^{\text{b}}$
Water activity	$0.191 \pm 0.005^{\text{a}}$	$0.143 \pm 0.003^{\text{c}}$	$0.166 \pm 0.003^{\text{b}}$	$0.182 \pm 0.003^{\text{a}}$	$0.134 \pm 0.005^{\text{c}}$	$0.162 \pm 0.005^{\text{b}}$
Density (g/cm^3)	$1.4714 \pm 0.0009^{\text{c}}$	$1.4727 \pm 0.0003^{\text{b}}$	$1.4759 \pm 0.0006^{\text{a}}$	$1.4324 \pm 0.0005^{\text{f}}$	$1.4639 \pm 0.0003^{\text{d}}$	$1.4602 \pm 0.0008^{\text{e}}$
Hygroscopicity ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$)	$17.82 \pm 0.16^{\text{c}}$	$14.26 \pm 0.48^{\text{d}}$	$22.70 \pm 1.02^{\text{a}}$	$14.25 \pm 0.19^{\text{d}}$	$15.17 \pm 0.39^{\text{d}}$	$18.10 \pm 0.04^{\text{b}}$
Time to dissolve in water (s)	$206 \pm 8^{\text{c}}$	$380 \pm 20^{\text{a}}$	$263 \pm 27^{\text{b}}$	$237 \pm 6^{\text{bc}}$	$396 \pm 14^{\text{a}}$	$278 \pm 16^{\text{b}}$
Time to dissolve in oil (s)	$131 \pm 12^{\text{b}}$	$157 \pm 8^{\text{a}}$	$121 \pm 8^{\text{b}}$	$84 \pm 9^{\text{c}}$	$112 \pm 5^{\text{b}}$	$89 \pm 8^{\text{c}}$

^{a-f} Means \pm standard deviation with different superscript letters in the same line indicate significant differences ($P < 0.05$) between the microcapsules.

W1: microcapsules with liquid whey; W2: microcapsules with liquid whey and inulin; W3: microcapsules with liquid whey and polydextrose; WR1: microcapsules with whey retentate; WR2: microcapsules with whey retentate and inulin; WR3: microcapsules with whey retentate and polydextrose.

As shown in Table 2.2, microcapsules W1 and W3 showed higher ($P < 0.05$) moisture content than the other microcapsules. Furthermore, no difference ($P > 0.05$) was observed between the microcapsules produced with whey retentate. Microencapsulation of probiotics using spray drying and different carrier agents (native rice starch and inulin without any bonding agents, or blends of milk with inulin or polydextrose) showed similar moisture content (AVILA-REYES et al., 2014, CORCORAN et al., 2004, FRITZEN-FREIRE et al., 2012). Besides, the moisture content of all the samples were below $4 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, which, as reported by Heidebach et al. (2010), is usually recommended for good stability throughout prolonged storage of probiotic powders.

The water activity of the powders ranged from 0.13 to 0.19, with microcapsules W1 and WR1 having the highest value although the range of differences was relatively small (Table 2.2). In addition, the water activity values are within the normal range for atomized products and also within the recommended limit to ensure microbiological stability (< 0.3) (TONON et al., 2009). Similar values of water activity have also been reported by Soukoulis et al. (2014) for microcapsules of *L. acidophilus* produced with maltodextrin and whey protein concentrate.

The density of spray-dried microcapsules was affected by the composition of the powder (Table 2.2). The density of the microcapsules produced with liquid whey (W1, W2 and W3) was higher ($P < 0.05$) than that of those produced with whey retentate (WR1, WR2 and WR3), i.e., the density decreased with the increase of the total solids content of the feed solutions. A similar behavior was observed by Elversson and Millqvist-Fureby (2005) for spray dried carbohydrates (lactose, mannitol and sucrose/dextran) with different solubility and crystallization propensity.

Microcapsules W3 and WR3 were the most hygroscopic (Table 2.2). This behavior could be attributed to the higher hygroscopicity of polydextrose, as reported by Farzanmehr and Abbasi (2009). In addition, microcapsules WR1 and WR3 were less hygroscopic than microcapsules W1 and W3, respectively ($P < 0.05$). This difference is probably related to the higher protein content in the composition of the microcapsules produced with whey retentate. Fang et al. (2012) reported the occurrence of denaturation of whey proteins during the spray drying process, which unfolds and exposes the hydrophobic amino acid residues that are usually hidden within them. Thus, due to a greater number of hydrophobic amino acid residues, the samples produced with

they retentate might have lower water adsorption. However, comparing samples prepared with polydextrose and inulin, the microcapsules containing inulin were less hygroscopic ($P < 0.05$). A similar behavior was noted by Fernandes, Borges, and Botrel (2014), who reported that the presence of inulin in microcapsules of rosemary essential oil caused a decrease in hygroscopicity under high relative humidity. Also according to these authors, inulin is an interesting carrier agent for the encapsulation of spray dried active compounds since lower water absorption values are desirable for better conservation and stability of the particles.

Similarly to the results obtained by Fávoro-Trindade et al. (2010) and Castro-Cislaghi et al. (2012), the time required to dissolve the microcapsules in water was higher than it was in oil for all the samples (Table 2.2). The presence of prebiotics in the composition of the microcapsules resulted in a longer dissolution time in water. According to Barclay et al. (2010), the solubility of prebiotics is closely related to the chain length of the polymer. In addition, the longest dissolution time noted in the microcapsules containing inulin (W2 and WR2) may be due to the low solubility of long-chain inulin (KIM; FAQIH; WANG, 2001) used in the present study that may have resulted in a slower rehydration of the powder. Therefore, this long dissolution time ensure good control of release of the probiotic when in contact with an aqueous solution. Nevertheless, no difference was detected among the samples produced with liquid whey or with whey retentate regarding the time of dissolution in water. On the other hand, samples produced with whey retentate required the shortest time to dissolve in oil. This fact may be explained, as previously discussed, by the higher protein content of this carrier agent. Thus, the exposure of hydrophobic and sulfhydryl groups due to denaturation of whey proteins during the spray drying process is greater in the microcapsules produced with whey retentate, which are consequently able to promote more protein-oil interactions, facilitating dissolution in this medium.

The color parameters for the *Bifidobacterium* BB-12 microcapsules samples are shown in Table 2.3. All the microcapsules showed high values for the L^* parameter; however, luminosity slightly increased with the addition of the prebiotic agents due to the whitish color of these ingredients. In relation to the a^* and b^* parameters, the microcapsules showed negative values for a^* and positive values for b^* , indicating a tendency to the color green and the color yellow, respectively. This fact was expected since, as cited by Siso (1996), whey is a greenish-yellow product. However, the use of whey retentate as

carrier agent enhanced the samples' tendency to the color green. This result occurred probably because of the presence of riboflavin in milk aqueous phase, since it is attributable for its slightly green coloration, as described by Nozière et al. (2006), suggesting that the retentate contains higher amounts of riboflavin.

Table 2.3: Color parameters of microcapsules of *Bifidobacterium* BB-12 prepared with liquid whey, whey retentate obtained from nanofiltration (NF) and prebiotics.

Microcapsules	L*	a*	b*
W1	95.45 ± 0.72 ^b	-0.87 ± 0.04 ^b	8.74 ± 0.16 ^a
W2	97.55 ± 0.28 ^a	-0.65 ± 0.05 ^a	6.50 ± 0.29 ^c
W3	97.68 ± 0.49 ^a	-0.77 ± 0.03 ^{ab}	6.70 ± 0.05 ^c
WR1	96.70 ± 0.33 ^{ab}	-1.25 ± 0.15 ^c	8.25 ± 0.08 ^b
WR2	97.64 ± 0.45 ^a	-1.08 ± 0.08 ^c	6.70 ± 0.12 ^c
WR3	97.61 ± 0.26 ^a	-1.07 ± 0.01 ^c	6.53 ± 0.08 ^c

^{a-c} Means ± standard deviation (n=3) with different superscript letters in the same column indicate significant differences (P < 0.05) between the microcapsules.

W1: microcapsules with liquid whey; W2: microcapsules with liquid whey and inulin; W3: microcapsules with liquid whey and polydextrose; WR1: microcapsules with whey retentate; WR2: microcapsules with whey retentate and inulin; WR3: microcapsules with whey retentate and polydextrose.

The evaluation of the thermal behavior of the microcapsules was carried out using the DSC and TG/DTG analysis. The DSC analysis provides information about exothermic, endothermic, and heat capacity changes of a system as a function of temperature or time. The DSC curves shown in Fig. 2.4 are related to the thermal properties and the phase change behaviors of raw materials (Fig. 2.4a) and microcapsules produced with liquid whey (W1, W2 and W3) (Fig. 2.4b) or whey retentate (WR1, WR2 and WR3) (Fig. 2.4c). The DSC curves showed different well-defined endothermic events for the raw material and microcapsules, corresponding to the melting process. The values of T_{peak} , T_{onset} and T_{endset} temperatures are shown in Table 2.4, as well as the enthalpy change obtained from the DSC measurements. It was observed that the melting temperatures and enthalpies have changed for the produced microcapsules. For instance, the obtained phase change temperature for the spray dried liquid whey (W) was $T_{\text{peak}} = 163.7 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H_{\text{fusion}} = - 138.5 \text{ J/g}$) and for the spray dried whey retentate (WR) was $T_{\text{peak}} = 170.6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H_{\text{fusion}} = - 179.6 \text{ J/g}$), while the microcapsules W1 and WR1 showed phase change at $T_{\text{peak}} = 169.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H_{\text{fusion}} = - 187.7 \text{ J/g}$) and at $T_{\text{peak}} = 178.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H_{\text{fusion}} = - 227.5 \text{ J/g}$), respectively.

Paramera, Konteles, and Karathanos (2011) reported that the appearance of new peaks as well as changes in peak temperature or enthalpy provide information about possible interactions in a system. Given that, the microcapsules T_{peak} at higher temperatures than raw material may confirm the better thermal stability of the microcapsules. Besides, the melting enthalpies of the microcapsules also were changed and this indicates that there is a possible interaction between liquid whey or whey retentate and prebiotics in the microencapsulation process. With regard to the microcapsules DSC measurements, samples W1 and WR1 showed melting temperature (T_{peak}) of 169.5 °C and 178.3 °C, respectively, while for the samples added with prebiotics (inulin and polydextrose), this temperature ranged between 186.4 °C and 190.7 °C. Therefore, the T_{peak} of W2, W3, WR2 and WR3 were shifted towards higher temperatures by the addition of inulin or polydextrose, indicating that the presence of these prebiotic agents improved the thermal stability of the microcapsules. A similar behavior was noted by Rodriguez Furlán et al. (2012) for the DSC study of bovine plasma protein freeze-dried with different saccharides (glucose, sucrose or inulin). These authors also reported that a carbohydrate concentration of 10 g 100 g⁻¹, the same used in the present study, produced optimal behavior in terms of melting temperature.

Figure 2.4: DSC curves of raw materials and *Bifidobacterium* BB-12 microcapsules. (a) W: spray dried liquid whey; WR: spray dried whey retentate; INU: inulin; PDX: polydextrose; (b) W1: microcapsules with liquid whey; W2: microcapsules with liquid whey and inulin; W3: microcapsules with liquid whey and polydextrose; (c) WR1: microcapsules with whey retentate; WR2: microcapsules with whey retentate and inulin; WR3: microcapsules with whey retentate and polydextrose.

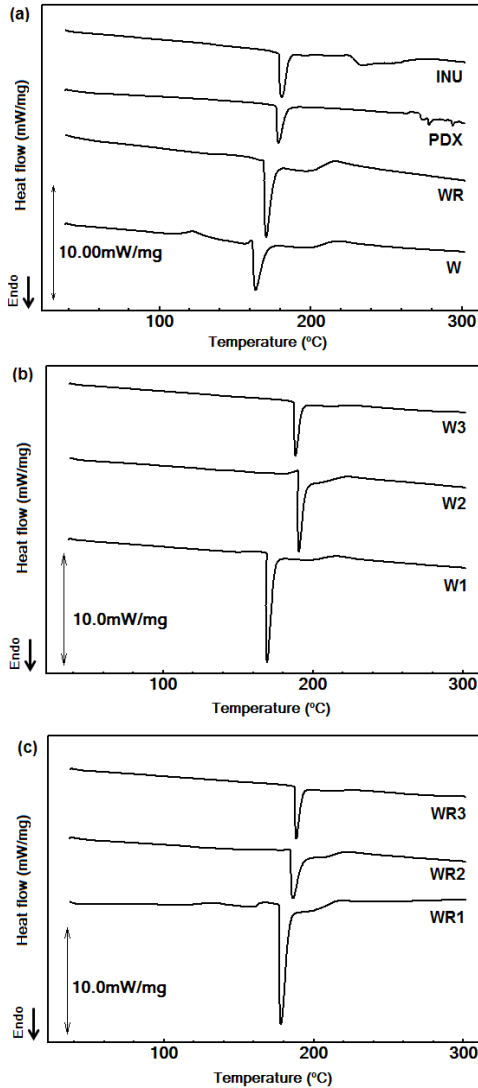


Table 2.4: The DSC of raw materials and microcapsules showing T_{peak} , T_{onset} and T_{endset} and enthalpy (ΔH) measurements.

Samples	T_{peak} (°C)	T_{onset} (°C)	T_{endset} (°C)	ΔH (J g ⁻¹)
W	163.7	162.2	169.5	-138.5
WR	170.6	168.9	176.2	-179.6
INU	181.0	179.0	185.6	-101.0
PDX	178.7	177.3	183.5	-81.1
W1	169.5	168.4	174.4	-187.7
W2	190.7	190.3	194.9	-159.3
W3	188.5	187.4	192.3	-87.3
WR1	178.3	177.3	183.5	-227.5
WR2	186.4	184.6	192.0	-155.7
WR3	188.5	187.5	192.4	-88.7

W: spray dried liquid whey; WR: spray dried whey retentate; INU: inulin; PDX: polydextrose; W1: microcapsules with liquid whey; W2: microcapsules with liquid whey and inulin; W3: microcapsules with liquid whey and polydextrose; WR1: microcapsules with whey retentate; WR2: microcapsules with whey retentate and inulin; WR3: microcapsules with whey retentate and polydextrose.

The thermogravimetric curves for the microcapsules produced with liquid whey (W1, W2, and W3) and with whey retentate (WR1, WR2, and WR3) are shown in Fig. 2.5 (a, b). The first mass loss of the TG/DTG occurred between 30 °C and 105 °C and it corresponds to water release. Above this temperature range, the decomposition process occurred in one or two steps of mass loss, according to each sample. The mass loss in the first step of decomposition with its respective temperature range and DTG_{peak} temperature are shown in Table 2.5. According to Macêdo et al. (1997), in these steps there can be decomposition reactions in the constituents of the microcapsules, i.e., proteins and carbohydrates. Furthermore, the DTG_{peak} can be seen in the inserted figures in Fig. 2.5, which represents the DTG curves of TG curves. Through the DTG curves it was possible to note that the temperature of the first decomposition event (DTG_{peak}) was higher for the samples containing inulin and polydextrose than for microcapsules W1 and WR1. Thus, the TG data combined with the DSC data make it possible to verify that there is a higher thermal stability of the microcapsules containing prebiotics. Nevertheless, as shown through the DSC and TG analyses, the thermal stability of the microcapsules was not affected by the use of liquid whey or whey retentate as carrier agents.

Fig. 2.5: TG/DTG curves of microcapsules of *Bifidobacterium* BB-12 microcapsules produced with: (a) liquid whey (W1), liquid whey and inulin (W2), liquid whey and polydextrose (W3) and (b) whey retentate (WR1), whey retentate and inulin (WR2) and whey retentate and polydextrose (WR3).

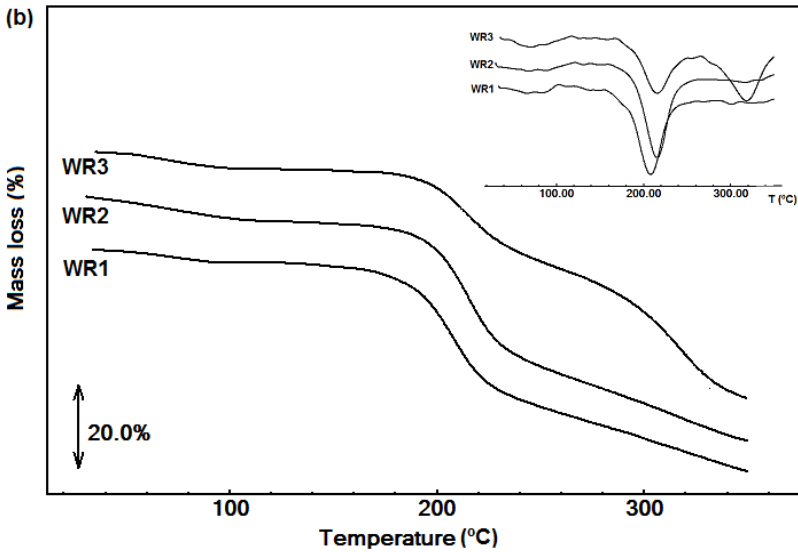
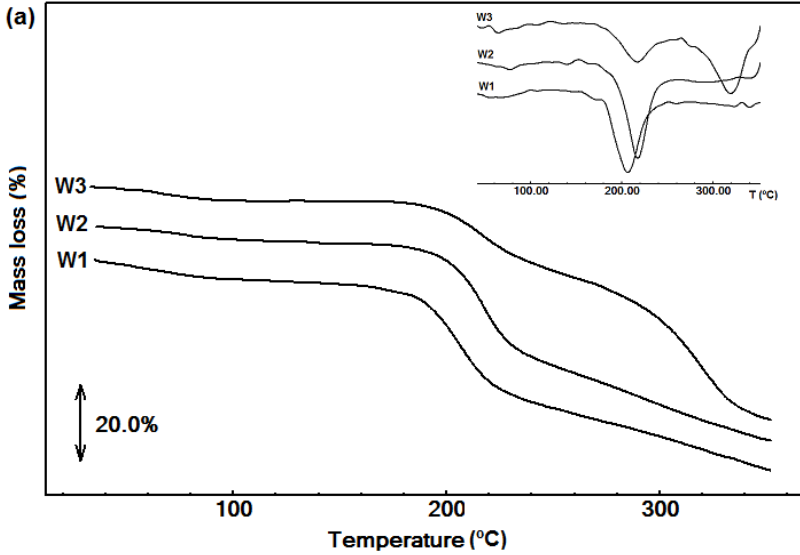


Table 2.5: The TG measurements of microcapsules showing mass loss (Δm) with respective temperature range and DTG_{peak} temperature.

Microcapsules	Temperature range (°C)	Δm (%)	DTG _{peak} (°C)
W1	156-252	32.2	206.3
W2	172-258	32.8	217.5
W3	172-266	20.6	217.2
WR1	155-265	35.6	208.2
WR2	163-261	35.8	215.4
WR3	168-248	20.8	215.6

W1: microcapsules with liquid whey; W2: microcapsules with liquid whey and inulin; W3: microcapsules with liquid whey and polydextrose; WR1: microcapsules with whey retentate; WR2: microcapsules with whey retentate and inulin; WR3: microcapsules with whey retentate and polydextrose.

4. CONCLUSIONS

The present study showed that all the combinations of carrier agents were able to maintain the viability of *Bifidobacterium* BB-12 during 90 days of storage under refrigeration and freezing conditions. However, the viability was not affected by the use of liquid whey or whey retentate, or by the presence of inulin or polydextrose.

The physical characteristics of the microcapsules were barely affected by the use of liquid whey or whey retentate as carrier agent. The morphology of the microcapsules was not affected by the use of prebiotics. In general, the microcapsules produced with inulin (W2 and WR2) had more desirable physical characteristics, such as lower values for moisture, water activity and hygroscopicity, as well as longer time to dissolve in water and oil. Regarding the thermal analysis, both prebiotic agents improved the stability of the microcapsules. Finally, liquid whey and inulin (W2) was the most appropriate combinations to be used as carrier agents to microencapsulate *Bifidobacterium* BB-12 by spray drying, showing great potential to be used in dairy products. Moreover, the use of whey for microencapsulation of probiotics is a promising alternative for its utilization.

REFERENCES

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of the association analytical chemists.** 18th. Edition. Maryland, USA, 2005.

AVILA-REYES, S. V. et al. Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p.423-430, 2014.

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

BARCLAY, T. et al. Inulin —a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. **Journal of Excipients and Food Chemicals**, v. 1, p. 27-50, 2010.

CAI, Y. Z.; CORKE, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 1248-1252, 2000.

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

CASTRO-CISLAGHI, F. P. et al. *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 113, p. 186–193, 2012.

CORCORAN, B. M. et al. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1024-1039, 2004.

DOHERTY, S B. et al. Development and characterization of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1604-1617, 2011.

DUONGTHINGOC, D. et al. Effect of whey protein agglomeration on spray dried microcapsules containing *Saccharomyces boulardii*. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1782–1788, 2013.

ELVERSSON, J.; MILLQVIST-FUREBY, A. Particle size and density in spray drying – Effects of carbohydrate properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, p. 2049-2060, 2005.

FANG, Y. et al. Functionality of milk protein concentrate: effect of spray drying temperature. **Biochemical Engineering Journal**, v. 62, p. 101-105, 2012.

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

FARZANMEHR, H.; ABBASI, S. Effects of inulin and bulking agents on some physico-chemical, textural and sensory properties of milk chocolate. **Journal of Texture Studies**, v. 40, p. 536–553, 2009.

FAVARO-TRINDADE, C. S. et al. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 336-340, 2010.

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

FRITZEN-FREIRE, C. B et al. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. **Food Research International**, v. 45, p. 306-312, 2012.

GHANDI, A. et al. Effect of shear rate and oxygen stresses on the survival of *Lactococcus lactis* during the atomization and drying stages of spray drying: a laboratory and pilot scale study. **Journal of Food Engineering**, v. 113, p. 194-200, 2012.

HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. **Journal of Food Engineering**, v. 98, p. 309-316, 2010.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION- IDF. **International Dairy Federation standard 26A**. Dried milk and dried cream: determination of water content. Brussels, Belgium: International Dairy Federation, 1993.

KIM, Y.; FAQIH, M. N.; WANG, S. S. Factors affecting gel formation of inulin. **Carbohydrate Polymers**, 46, 135-145, 2001.

LIAN, W. C.; HSIAO, H. C.; CHOU, C. C. Survival of bifidobacteria after spray-drying. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 79-86, 2002.

LITTRINGER, E. M. et al. The morphology and various densities of spray dried mannitol. **Powder Technology**, v. 246, p. 193-200, 2013.

MACIEL, G. M. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p.1991-1998, 2014.

MACÊDO, R. O. et al. Comparative studies on some analytical methods: Thermal decomposition of powder milk. **Journal of Thermal Analysis**, v. 49, p. 857-862, 1997.

NOZIÈRE, P. et al. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. **Animal Fees Science and Technology**, v. 131, p. 418-450, 2006.

OKURO, P. K. et al. Co- encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. **Food Research International**, v. 53, p. 96-103, 2013.

PARAMERA, E. I.; KONTELES, S. J.; KARATHANOS, V. T. Microencapsulation of curcumin in cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Chemistry**, v. 125, p. 892-902, 2011.

PIMENTEL-GONZÁLEZ, D. J. et al. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 42, p. 292-297, 2009.

PRASANNA, P. H. P.; GRANDISON, A. S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Bifidobacteria in milk products: An overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits. **Food Research International**, v. 55, p.247-262, 2014.

RAJAM, R. et al. Effect of whey protein – alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, v. 4, p. 891-898, 2012.

RÉ, M.I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v. 16, p. 1195-1236, 1998.

ROBERFROID, M. B. Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 2493-2502, 2007.

RODRIGUEZ FURLÁN, L. T. et al. Stabilizing effect of saccharides on bovine plasma protein: a calorimetric study. **Meat Science**, v. 91, p. 478-485, 2012.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I.J.; TALMON, Y. A scanning electron microscopy study of microencapsulation. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 139-144, 1985.

SHEU, T. Y.; MARSHALL, R. T.; HEYMANN, H. Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1902-1907, 1993.

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

SOUKOULIS, C. et al. Impact of milk protein type on the viability and storage stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 using spray drying. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 1255-1268, 2014.

STOWELL, J. D. Prebiotic potential of polydextrose. In: CHARALAMPOPOULOS D.; RASTALL, A (Eds.). **Probiotics and prebiotics science and technology**. New York: Springer, p. 347-352, 2009.

TEIXEIRA, M. I. et al. Characterization of short chain fatty acid microcapsules produced by spray drying. **Materials Science and Engineering C**, v. 24, p. 653-658, 2004.

TONON, R. V. et al. Physicochemical and morphological characterisation of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p.1950-1958, 2009.

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

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

CAPÍTULO 3 - INFLUÊNCIA DA MICROENCAPSULAÇÃO COM SORO DE LEITE E PREBIÓTICOS NA SOBREVIVÊNCIA DE *BIFIDOBACTERIUM* BB-12 SUBMETIDA A CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS E A TRATAMENTOS TÉRMICOS

Artigo publicado:

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

RESUMO

O micro-organismo probiótico *Bifidobacterium* BB-12 foi microencapsulado com soro de leite e dois diferentes prebióticos (inulina e polidextrose) e a sua sobrevivência foi avaliada durante o processo de microencapsulação por *spray drying* e após exposição a condições gastrointestinais simuladas e tratamentos térmicos. As microcápsulas produzidas somente com soro de leite apresentaram maior viabilidade após o processo de *spray drying* ($9,54 \log \text{UFC g}^{-1}$) e maior rendimento de microencapsulação (95,43%). Após a exposição às condições gastrointestinais simuladas, as microcápsulas preparadas somente com soro de leite e aquelas preparadas com soro de leite e inulina apresentaram maior sobrevivência do que as células livres, apresentando redução de 0,49 e 0,97 logs, respectivamente. Por outro lado, as microcápsulas produzidas com soro de leite e polidextrose foram as que apresentaram a maior redução na viabilidade da bactéria (2,45 logs) após a simulação das condições gastrointestinais. Com relação à sobrevivência do probiótico submetido aos tratamentos térmicos, as microcápsulas produzidas somente com soro de leite conferiram maior efeito protetor. No entanto, as microcápsulas produzidas com soro de leite e polidextrose não conferiram proteção às células probióticas quando estas foram submetidas aos tratamentos térmicos.

Palavras-chave: Probiótico. Soro de leite. *Spray drying*. Inulina. Polidextrose. Condições de estresse.

Influence of microencapsulation with sweet whey and prebiotics on the survival of *Bifidobacterium*-BB-12 under simulated gastrointestinal conditions and heat treatments

ABSTRACT

Bifidobacterium BB-12 was microencapsulated with sweet whey and two different prebiotics (inulin and polydextrose) and its survival was evaluated during spray drying and after exposure to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. The microcapsules produced only with sweet whey showed the highest viability after spray drying (9.54 log CFU g⁻¹) and the highest encapsulation yield (95.43%). After exposure to simulated gastrointestinal conditions, the microcapsules prepared only with sweet whey and those prepared with sweet whey and inulin provided better protection of the bifidobacteria when compared with the free cells, with a reduction of 0.49 and 0.97 logs, respectively. On the other hand, the microcapsules produced with sweet whey and polydextrose showed the highest reduction level (2.45 logs) after simulated gastrointestinal conditions. Regarding the survival of probiotics under heat treatments, the microcapsules produced only with sweet whey conferred greater protective effect when compared to the free cells. However, the microcapsules produced with sweet whey and polydextrose did not confer any protection to the probiotic cells under heat treatments.

Keywords: Probiotic. Whey. Spray drying. Inulin. Polydextrose. Stress conditions.

1. INTRODUCTION

Probiotic bacteria have been incorporated into a wide range of foods because of their beneficial effects on human health, such as regulation of the gastrointestinal tract, stimulation of the immune system, decrease in serum cholesterol levels and in lactose intolerance, as well as prevention of cancer and cardiovascular disease (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010). The efficacy of probiotics is mainly related to their viability in a product at the time of its consumption; therefore, it has been recommended that formulations should contain at least 10⁶ CFU per gram of product (PICOT; LACROIX, 2004; TRIPATHI; GIRI, 2014). These requirements have a significant impact on the technological challenges of incorporating

probiotics in different food products. Processing conditions during production can lead to significant losses of probiotic viability due to cellular injuries caused by heat treatment, mechanical or osmotic stress (FU; CHEN, 2011). However, not only the food production processes and storage conditions, but also the physical circumstances of the human gastrointestinal tract after ingestion strongly influence on the survival of probiotic bacteria and consequently their effectiveness (SCHELL; BEERMANN, 2014). The acidic environment and enzymes of the stomach as well the bile salts secreted into the duodenum are the main obstacles for the survival of the ingested bacteria (DEL PIANO et al., 2011). Thus, strategies have been proposed aiming to maintain the viability of probiotic microorganisms during production, storage and consumption of the food to which they are added.

Microencapsulation has proven to be a promising method for bacterial cell protection and several studies have been carried out investigating the protective role of this technique against the adverse conditions to which probiotics can be exposed (FRITZEN-FREIRE et al., 2013; KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014). The spray drying method is commonly used for probiotic encapsulation because it is convenient in terms of energy requirements, cost, and process yield. It uses equipment that is readily available and produces good quality powder particles (FERNANDES; BORGES; BOTRE, 2014; YONEKURA et al. 2014). However, it is important to mention that cell dehydration may inevitably cause membrane damage and inactivation depending on the technological conditions applied (PAÉZ et al., 2012). Consequently, selecting a suitable drying medium is crucial because it might enhance the survival rate of the bacteria throughout spray drying (SILVA et al., 2011). Besides, it is important that the encapsulating matrix offers good protection for probiotic microorganisms from heat treatments in food processing and also during gastrointestinal transit.

Among the biopolymers used as carrier agents, sweet whey and its derivatives appear as potential candidates for protecting probiotic viability (MACIEL et al., 2014; RODRIGUES et al., 2011; PINTO et al., 2015). Sweet whey can be regarded as a major by-product of the dairy industry, originating from cheese and casein manufacture. Some of the most important components of whey are lactose and soluble proteins (SMITHERS, 2008; SOUZA et al., 2010). Castro-Cislaghi et al. (2012) verified that sweet whey in its liquid form is a promising carrier agent for probiotic microencapsulation by spray drying and a new alternative for exploiting the utilization of whey. These authors also noted a slight decrease in the viability of microencapsulated *Bifidobacterium* BB-12 at

low pH. The protective effect of sweet whey as carrier agent of *Lactobacillus acidophilus* La-5 was also observed by Maciel et al. (2014). The produced microcapsules were able to protect the cells during exposure to simulated gastrointestinal conditions. Additionally, prebiotics have been successfully tested as co-components for microencapsulation and have conferred beneficial effects on cell viability. Fritzen-Freire et al. (2013) verified that the partial replacement of reconstituted skim milk with prebiotics conferred protection for *Bifidobacterium* BB-12 submitted to simulated gastrointestinal conditions and extreme heat treatments. Krasaekoopt and Watcharapoka (2014) also demonstrated that the addition of prebiotics in alginate beads coated with chitosan provided better protection to probiotics in simulated digestive system.

However, to our knowledge, there have been no published data where liquid sweet whey in combination with prebiotic agents was employed as carrier agent for microencapsulation of probiotics by spray drying. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of microencapsulation by spray drying using sweet whey and prebiotics (inulin and polydextrose) as carrier agents on the survival of *Bifidobacterium* BB-12 during the encapsulation process and under stress conditions, such as simulated gastrointestinal conditions and heat treatments.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Commercial pasteurized milk (3 g fat 100 mL⁻¹) and commercial rennet with a chymosin produced by *Aspergillus niger var awamori* (with a strength of 1/3,000, Ha La[®], Chr. Hansen, Valinhos, Brazil) were used for obtaining the sweet whey. A probiotic culture composed of *Bifidobacterium* BB-12 (BB-12[®], Chr. Hansen, Hønsholm, Denmark) was used as the active material for the microcapsules, while commercial skim milk powder (Molico[®], Nestlé, São Paulo, Brazil) was employed for preparation of bacterial suspension. The carrier agents used were sweet whey in its liquid form and the prebiotics inulin (Orafti[®] HPX, Orafti, Tienen, Belgium), with degree of polymerization (DP) ≥ 23, and polydextrose (STA-LITE[®] III, Tate & Lyle, Decatur, IL, USA) with DP ranging from 10 to 12. The sweet whey was obtained as described by Pinto et al. (2015). MRS Agar (Difco, Sparks, USA), lithium chloride (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), sodium propionate (Fluka, Neu-Ulm,

Germany) and AnaeroGen® (Oxoid, Hampshire, UK) were used for the microbiological analysis. MRS Broth (Difco, Sparks, USA) was used as a suspending medium in heat treatments. Pepsin from porcine gastric mucosa (≥ 400 U/mg protein), α -amylase from *Aspergillus oryzae* (28.75 U/mg protein), pancreatin from porcine pancreas (8 x USP specification) and bile salts used for the *in vitro* simulated gastrointestinal conditions were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other reagents used were of analytical grade.

2.2 Preparation of the bacterial suspension

The bacterial suspension was prepared following the procedures described by Fritzen-Freire et al. (2012). This stock solution was incubated at 37 ± 1 °C for 2 h and either inoculated into the feed solutions for microencapsulation by spray drying or directly used as free cells in the assays.

2.3 Preparation of the drying media and microencapsulation

The feed solutions used for the production of spray dried *Bifidobacterium* BB-12 microcapsules consisted only of sweet whey (SW), sweet whey and 100 g L^{-1} of inulin (SWI) and sweet whey and 100 g L^{-1} of polydextrose (SWP). These levels were selected based on previous studies (Fritzen-Freire et al., 2012). All the media were homogenised and heat treated at 80 °C for 30 min. The feed solutions were left to cool down to room temperature and then, under magnetic stirring, the bacterial suspension (50 mL L^{-1}) was added to each solution. The feed solutions were kept under constant agitation during the microencapsulation process.

The blends of carrier agents and the bacterial suspension were spray dried in a laboratory scale spray dryer (B-290 mini spray dryer, Buchi, Flawil, Switzerland), operating at constant air inlet temperature of 150 °C and outlet temperature of 50 ± 3 °C, as described by Fritzen-Freire et al. (2012). The dried powder samples were collected from the base of the cyclone, placed in sterile plastic vials and stored at -20 ± 1 °C. The entire process for the production of the probiotic powders was performed in triplicate, and the analyses were performed using samples from all the batches.

2.4 Enumeration of bifidobacteria

The bifidobacteria were enumerated by the pour plate method on MRS agar modified with the addition of 0.2 g 100g⁻¹ lithium chloride and 0.3 g 100g⁻¹ sodium propionate, as proposed by Vinderola and Reinheimer (1999). The plates were incubated in anaerobic jars containing AnaeroGen[®] at 37 ± 1 °C for 72 h. The count of viable probiotic cells was expressed as log colony-forming units per gram (log CFU g⁻¹). However, prior to enumeration, to ensure the complete release of the entrapped bacteria from inside the microcapsules, the samples (1 g) were re-suspended in 9 mL of phosphate buffer (0.1 mol L⁻¹, pH 7.0) followed by homogenization using a magnetic stirrer for 10 min, according to the methodology proposed by Sheu, Marshall, and Heymann (1993). All the experiments were performed in triplicate.

2.5 Encapsulation yield

The encapsulation yield (EY), which is a criterion for measuring the influence of the encapsulation procedure on the number of viable cells, was calculated by means of Eq. (3.1) (PICOT; LACROIX, 2004):

$$EY = (N/N_0) \times 100 \quad (3.1)$$

where N is the number of viable cells (log CFU g⁻¹) of dry matter in microcapsules, and N₀ is the number of viable cells (log CFU g⁻¹) of dry matter in the feed solutions (before drying).

2.6 Survival of free and microencapsulated cells under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions

The *in vitro* simulated gastrointestinal conditions were carried out according to the procedure described by Madureira et al. (2011), with some modifications. The typical conditions prevailing in the human mouth, esophagus-stomach, duodenum and ileum were sequentially simulated. The parameters (enzymes solutions, pH values, period of time and intensities of stirring in each part of the human digestive system) used to simulate this resistance are described in Table 3.1. It is noteworthy that the enzyme solutions were prepared freshly and filter-sterilized using a 0.22 µm-membrane filter (MF-Millipore, Billerica MA, USA) prior to use; after sterilization, all the solutions were kept in an ice bath during the entire period of simulation prior to being gradually added (when appropriate).

Table 3.1: Processing conditions used in each step of the simulated gastrointestinal conditions (adapted from Madureira et al., 2011, with modifications).

Steps	Simulated conditions	Stirring (rpm)	Final pH	Time (min)
Mouth	α -amylase + CaCl_2	200	6.9	2
Esophagus-stomach	Pepsin + HCl	130	5.5	10
			4.6	10
			3.8	10
			2.8	20
			2.3	20
Duodenum	Pancreatin + bile salts + NaHCO_3	45	5.0	20
			2.0	20
Ileum	NaHCO_3	45	6.5	90

To simulate the temperature and the intensity of peristaltic movements in each part of the human digestive system, a water bath (Dist DI950M, Florianópolis SC, Brazil) maintained at 37 ± 1 °C was used; mechanical agitation was applied with intensities resembling those attained in each of the digestive steps. The free (1 mL) or microencapsulated (1 g) bifidobacteria were placed into sterile flasks. For the mastication step (mouth) simulation the pH was adjusted to 6.9 with $1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ and a saliva solution prepared with 100 U/mL of the α -amylase in $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ was added to the samples at a rate of $24 \mu\text{L min}^{-1}$ for 2 min, with stirring at 200 rpm. In the esophagus–stomach step, the pH of the samples was decreased until it reached 2 using $1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$. After $50 \mu\text{L}$ of pepsin solution (25 mg mL^{-1} in $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$) was added in equal-sized aliquots during the whole gastric phase, totaling 90 min at 130 rpm of stirring. To simulate the duodenum step the acidity was raised to pH 5 by addition of $1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$. Then, at the beginning of this step, $250 \mu\text{L}$ of pancreatin-bovine bile salts solution (2 g L^{-1} of pancreatin and 12 g L^{-1} of bovine bile salts in $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$) was added. In this step, stirring at 45 rpm for 20 min was employed. Finally, for the ileum step, in which the stirring was also maintained at 45 rpm for 90 min, the pH was increased to 6.5 by addition of $1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$.

At the end of each step, samples were analyzed to evaluate the count of viable bifidobacteria cells as previously described in Section 2.5. The simulated gastrointestinal conditions were continuous, thus the overall working volume increased, i. e., exactly as happens during actual

digestion. Therefore, the dilution of each sample was corrected with peptone water ($0.1 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$) until reaching 9 mL g^{-1} of microcapsules or 9 mL mL^{-1} of free cells suspension.

The survival rate of bifidobacteria under simulated gastrointestinal conditions was calculated according to Eq. (3.2) (GUO et al., 2009):

$$\text{Survival rate (\%)} = \log \text{CFU } N_1 / \log \text{CFU } N_0 \quad (3.2)$$

where N_1 was the total count of viable bifidobacteria after exposure to each step of the simulated gastrointestinal conditions and N_0 was the initial count of viable bifidobacteria before going through each step.

2.7 Survival of free and microencapsulated cells under heat treatments

The resistance of the free and the microencapsulated *Bifidobacterium* BB-12 to heat treatments (60, 65 and 70 °C for 5, 10 and 15 min) was assessed using MRS broth as a suspending medium, as proposed by Trabelsi et al. (2013). One gram of microcapsules or 1 mL of the free cells suspension was transferred into test tubes containing 9 mL of MRS broth each. After the heat treatments (water bath), the content was cooled to room temperature ($\sim 25^\circ\text{C}$) and then the count of viable bifidobacteria cells was performed as previously described in Section 2.5.

2.8 Statistical analysis

The data analysis was carried out with the STATISTICA 7.0 software (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Analysis of variance (ANOVA) was applied to determine significant differences ($P < 0.05$) between results and Tukey's test was used to compare means values. The data were expressed as mean \pm standard deviation.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Enumeration of the bifidobacteria and encapsulation yield

The count of viable bifidobacteria cells in the feed solutions (before spray drying) in the microcapsules produced with different carrier agents and the encapsulation yields are shown in Table 3.2.

Table 3.2: Viable cells counts of *Bifidobacterium* BB-12 in the feed solutions and in the microcapsules produced with different carrier agents and the encapsulation yields (EY).

Samples	Number of viable cells (log CFU g ⁻¹)		EY (%)
	Feed (N _o)	Solution Microcapsules (N)	
SW	9.99 ± 0.09 ^a	9.54 ± 0.12 ^a	95.43 ± 0.24 ^a
SWI	9.40 ± 0.08 ^b	8.79 ± 0.03 ^b	93.55 ± 0.44 ^b
SWP	9.63 ± 0.03 ^b	8.50 ± 0.06 ^b	88.30 ± 0.55 ^c

^{a-b} Means ± standard deviation with different superscript letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$).

SW: samples prepared with sweet whey; SWI: samples prepared with sweet whey and inulin; SWP: samples prepared with sweet whey and polydextrose.

The feed solution and microcapsules produced only with sweet whey (SW) showed higher ($P < 0.05$) viable cell counts when compared to the samples produced with prebiotics (SWI and SWP). However, all the combinations of the carrier agents resulted in high encapsulation yields of *Bifidobacterium* BB-12 (above 85%). The encapsulation yields were significantly affected by the composition of the feed solutions. The highest value ($P < 0.05$) was observed in the SW microcapsules, followed by the SWI and the SWP microcapsules, respectively. Although all the samples contained sweet whey, the SW microcapsules showed a higher content of this carrier than those produced with prebiotics, which may have influenced on the encapsulated yield. Several authors suggest that the effectiveness of dairy carriers in protecting cell viability during drying is related to the presence of lactose and milk proteins, which may interact with the cell membrane of the microorganisms, preventing the membrane from breaking during water removal (ANANTA; VOLKERT; KNORR, 2005; FU; CHEN, 2011; SOUKOULIS et al., 2014). When comparing the microcapsules prepared with sweet whey and prebiotic agents, those produced with inulin (SWI) showed a higher protection of the bacteria during spray drying. This result may have occurred because, as described by Fritzen-Freire et al. (2012), inulin acts as a thermoprotector for the *Bifidobacterium* BB-12 cells undergoing spray drying, rendering a positive effect on their survival during the encapsulation process. Moreover, the high encapsulating yield observed in the present study may also be attributed to the relatively mild outlet temperature (50 ± 3 °C) that was kept during drying and also to the natural resistance of the microorganism. Simpson et al. (2005) evaluated the survival of various species of the genus *Bifidobacterium* following spray drying and

verified that *Bifidobacterium* BB-12 showed more than 70% survival after spray drying in reconstituted skim milk (20% w/v) at an outlet temperature of 85-90 °C.

The encapsulating yields obtained in this study can be considered satisfactory when compared to those of other similar studies. Maciel et al. (2014) reported an average encapsulated yield of 76.6% for *Lactobacillus acidophilus* La-5 using sweet whey and skim milk as encapsulating materials at an outlet of 85-95°C. Fritzen-Freire et al. (2013) noted encapsulating yields ranging from 70.6 to 75.7 % for *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulated with reconstituted skim milk and prebiotics at an outlet of 52-58 °C. On the other hand, Rajam and Anandharamakrishnan (2015) verified encapsulating yield of 98.6% for *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) microencapsulated with fructooligosaccharide and denatured whey protein isolate at an outlet of 52-58 °C.

3.2 Survival of free and microencapsulated cells under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions

The viable cells count and the survival rates of the free and the microencapsulated *Bifidobacterium* BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions are shown in Fig. 3.1 and in Table 3.3, respectively.

Different susceptibilities were observed among the samples evaluated during gastrointestinal simulation. No decrease in bifidobacteria cell counts was detected ($P > 0.05$) after exposure to simulated mouth conditions. The maintenance of probiotic viability after this step is probably related with the short time of contact with the enzyme and also with the buffering capacity of the sodium bicarbonate present in the enzyme solution.

Figure 3.1: Survival of free and microencapsulated *Bifidobacterium* BB-12 after each step of the simulated gastrointestinal conditions. SW: microcapsules only with sweet whey (■); SWI: microcapsules with sweet whey and inulin (●); SWP: microcapsules with sweet whey and polydextrose (▲); Free cells (◇). The error bars represent standard deviation of mean.

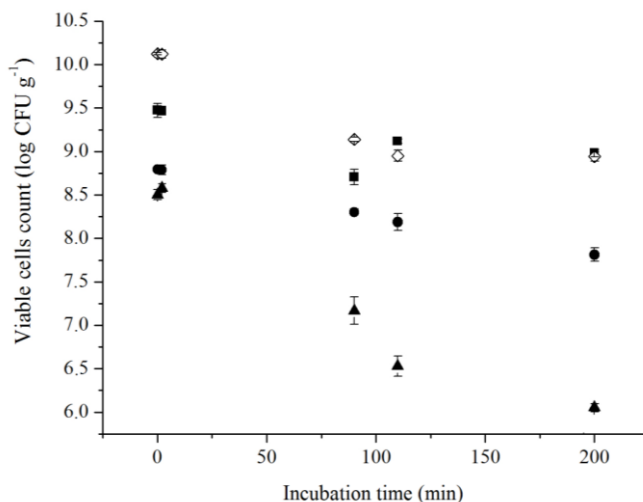


Table 3.3: Survival rates (%) of *Bifidobacterium* BB-12 free and microencapsulated after each step of the simulated gastrointestinal conditions.

Steps	SW	SWI	SWP	Free cells
Initial	-	-	-	-
Mouth	99.95 ± 0.5 ^{ba}	99.94 ± 0.63 ^{aA}	100.86 ± 0.57 ^{aA}	99.97 ± 0.48 ^{aA}
Esophagus-	91.94 ± 0.92 ^{cB}	94.47 ± 0.41 ^{ba}	83.58 ± 1.83 ^{cC}	90.29 ± 0.24 ^{cB}
Stomach	104.73 ± 0.27 ^{aA}	98.63 ± 1.13 ^{aB}	91.09 ± 1.62 ^{bC}	96.21 ± 0.70 ^{bB}
Duodenum	98.49 ± 0.46 ^{ba}	95.42 ± 0.97 ^{bb}	92.69 ± 0.75 ^{bc}	99.89 ± 0.57 ^{aA}
Ileum				

^{a-c} Means ± standard deviation with different superscript letters in the same column indicates significant differences ($P < 0.05$) among each step of the simulated gastrointestinal conditions for the same sample.

^{A-C} Means ± standard deviation with different superscript letters in the same row indicates significant differences ($P < 0.05$) among samples for each step of the simulated gastrointestinal conditions.

SW: microcapsules with sweet whey; SWI: microcapsules with sweet whey and inulin; SWP: microcapsules with sweet whey and polydextrose.

However, when the samples were exposed to the simulated esophagus-stomach conditions, the viable cell count and survival rate of the bifidobacteria decreased ($P < 0.05$). This step was the most detrimental to the survival of the bacteria for all the samples (Table 3.3), thus suggesting their sensitivity towards simulated gastric juice containing HCl and pepsin. The microcapsules produced with sweet whey and inulin (SWI) were less susceptible to the esophagus-stomach conditions than the microcapsules produced only with sweet whey (SW) and the free cells. On the other hand, the microcapsules prepared with sweet whey and polydextrose (SWP) were the most sensitive and showed a survival rate lower than the SW and SWI microcapsules and the free cells. The additional protective effect of the SWI microcapsules on the *Bifidobacterium* BB-12 survival rate in this step may be attributed to the low solubility of the long-chain inulin (KIM; FAQIH; WANG, 2001) used in the present study. This low solubility may have resulted in a slower rehydration of the powder and consequently a slower release of the encapsulated bacteria cells. Krasaekoopt and Watcharapoka (2014) also verified that the addition of inulin during microencapsulation of *L. acidophilus* and *L. casei* 01 in alginate beads coated with chitosan increased the resistance of these probiotics to low pH.

The count of viable cells of bifidobacteria in the SW microcapsules after exposure to simulated duodenum conditions (i.e. bile salts, pancreatin and pH 5.0) slightly increased from 8.70 to 9.12 log CFU g⁻¹ ($P < 0.05$); meanwhile, this behavior was not noted in the other samples. However, as reported by Picot and Lacroix (2004), the increase recorded in the SW microcapsules could not be attributed to cell multiplication and it probably resulted from a recovery of sub lethally-injured cells. Conversely, the free cells and the SWI and SWP microcapsules were apparently in a fragile state when they reached this step due to damages caused by the acidic conditions before exposure to the duodenum conditions, thus recovery of probiotic cells was eventually not possible. Moreover, the duodenum conditions seem to have had a particularly negative effect on the free cells and on the SWP microcapsules since a decrease ($P < 0.05$) in the viable cell count was noted. Thus, the increase of pH in the duodenum step appeared to be favorable for the survival of probiotic cells in the SW microcapsules. Maciel et al. (2014) also verified an increase in viability of *L. acidophilus* La-5 microencapsulated with sweet whey or skim milk during exposure to simulated gastrointestinal conditions when the pH was increased from 2 to 7. Furthermore, according to Rodrigues et al.

(2011), due to their buffering capacity, proteinaceous matrices have been claimed to convey a protective effect, especially under low pH-gastric conditions.

After the simulated ileum conditions, the SWI and the SWP microcapsules showed a decrease ($P < 0.05$) in viable bifidobacteria cells. On the other hand, no significant variations in the viable cells count were observed for the free cells and the SW microcapsules, which, according to Madureira et al. (2011), can be explained by the neutral pH (around 6.5) prevailing in this step.

Concerning the viability after all the steps of the simulated gastrointestinal conditions, the free cells count showed a decrease of $1.18 \log \text{CFU g}^{-1}$, while the microencapsulated bacteria showed decrease levels of 0.49, 0.97 and $2.45 \log \text{CFU g}^{-1}$ for SW, SWI and SWP, respectively. The lower survival of *Bifidobacterium* BB-12 in the microcapsules prepared with sweet whey and polydextrose (SWP) could be related with sub-lethal heat injuries suffered by the cells. Such injuries did not reflect on the encapsulating yield but they may lower the resistance of the cells in harsh environments such as those in simulated gastrointestinal conditions (e.g. enzymes, bile salts) (GOLOWCZYC et al., 2011).

3.3 Survival of the free and microencapsulated cells under heat treatment

In order to investigate the efficacy of the microcapsules in protecting *Bifidobacterium* BB-12 against heat, the survival of the free and microencapsulated cells was evaluated after exposure to temperatures of 60, 65 and 70 °C for 5, 10 and 15 min (Table 3.4), which correspond to conditions of heat treatments used in food processing.

Table 3.4: Effect of heat treatments on viable counts of *Bifidobacterium* BB-12 free and microencapsulated with different carrier agents.

Temp(°C)	Time (min)	Number of viable cells (log CFU g ⁻¹)			
		SW	SWI	SWP	Free cells
60	0	9.54±0.12 ^a	8.79±0.02 ^a	8.50±0.06 ^a	10.12± 0.01 ^a
	5	8.31±0.12 ^b	6.98±0.03 ^b	7.01±0.04 ^b	7.55±0.03 ^b
	10	7.16±0.07 ^c	6.29±0.07 ^c	NP	7.12±0.02 ^c
	15	6.45±0.04 ^d	NP	NP	6.27±0.01 ^d
65	0	9.54±0.12 ^a	8.79±0.02 ^a	8.50± 0.06	10.12±0.01 ^a
	5	8.17±0.14 ^b	6.30±0.17 ^b	NP	7.27±0.05 ^b
	10	6.58±0.08 ^c	6.11±0.02 ^b	NP	6.12±0.01 ^c
	15	6.38±0.10 ^c	NP	NP	NP
70	0	9.54±0.12 ^a	8.79± 0.02	8.50± 0.06	10.12± 0.01
	5	6.45±0.04 ^b	NP	NP	NP
	10	6.27±0.01 ^c	NP	NP	NP
	15	NP	NP	NP	NP

NP = not probiotic enumeration (minor than 6 log CFU g⁻¹)

^{a-d} Means ± standard deviation with different superscript letters in the same column indicate significant differences (P < 0.05) among times studied for same sample in the same temperature evaluated.

SW: microcapsules with sweet whey; SWI: microcapsules with sweet whey and inulin; SWP: microcapsules with sweet whey and polydextrose.

The free cells were more sensitive to heat shock than the microencapsulated cells at 60 °C, with their counts decreasing 2.57 log cycles after 5 min. However, the free cells maintained the probiotic count (> 6.00 log CFU g⁻¹) after exposure for 15 min at 60 °C and for 10 min at 65 °C.

Regarding the survival of the microencapsulated cells, the results revealed that those produced only with sweet whey (SW) were less susceptible to the heat treatments than the free cells and the SWI and the SWP microcapsules at 60 and 65 °C. Besides, at 70 °C, only the SW microcapsules were able to maintain probiotic count above 6 log CFU g⁻¹, which represents effective probiotic dosages according to the recommended probiotic criterion necessary to achieve therapeutic benefits (PICOT; LACROIX, 2004; TRIPATHI; GIRI, 2014). On the other hand, the microcapsules produced with sweet whey and polydextrose (SWP) were the most sensitive to the heat treatments since their number decreased from 8.50 log cycles to less than 6.00 log after 10 min at 60 °C and after 5 min at 65 and 70 °C. Thus, microencapsulation using polydextrose as carrier agent was not effective

in the protection of the bifidobacteria during the heat treatments. The reason that the SWP microcapsules offered little protection against heat could be associated with damages suffered by the cells during the spray drying process, which resulted in microcapsules with lower capacity to withstand the heat treatments. It has been shown that microorganisms that have been injured, but not killed, by exposure to stress often become considerably more sensitive to other types of stress (ANANTA et al., 2005; YONEKURA et al., 2014). In comparison, the microcapsules produced with sweet whey and inulin (SWI) showed higher thermal resistance than the SWP microcapsules. This might be due to the different structures and chemical compositions of each prebiotic. According to Wada et al. (2005), long-chain inulin with a high degree of polymerization (used in the SWI microcapsules) shows high thermal stability and low solubility, which might have led to slower diffusion of the suspending medium, thus rendering higher protection of the bifidobacteria.

4. CONCLUSION

The microencapsulation of *Bifidobacterium* BB-12 using only sweet whey was found to be the most effective in maintaining the viability of bacteria after spray drying and during exposure to gastrointestinal conditions and heat treatments. Although microcapsules containing inulin were less susceptible to the gastrointestinal conditions than the free cells, the incorporation of this prebiotic in the microcapsules did not confer additional protection to the probiotics bacteria. Moreover, the presence of polydextrose in the microcapsules did not provide any protection to *Bifidobacterium* BB-12 under stress conditions.

REFERENCES

- ANANTA, E.; VOLKERT, M.; KNORR, D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 399-409, 2005.
- CASTRO-CISLAGHI, F. P. et al. *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 113, p. 186–193, 2012.

DEL PIANO, M. et al. Is microencapsulation the future of probiotic preparations? The increased efficacy of gastro-protected probiotics. **Gut Microbes**, v. 2, 2, p.120-123, 2011.

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

FRITZEN-FREIRE, C. B et al. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. **Food Research International**, v. 45, p. 306-312, 2012.

FRITZEN-FREIRE, C. B. et al. Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. **LWT- Food Science and Technology** v. 50, p.39-44, 2013.

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

GOLOWCZYC, M. A. et al. Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 556–60, 2011.

GUO, Z. et al. In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 1640-1646, 2009.

KIM, Y.; FAQIH, M. N.; WANG, S. S. Factors affecting gel formation of inulin. **Carbohydrate Polymers**, 46, 135-145, 2001.

KRASAEEKOOPT, W.; WATCHARAPOKA, S. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, p.761-766, 2014.

MACIEL, G. M. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p.1991-1998, 2014.

- MADUREIRA, A. R. et al. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, p.465-470, 2011.
- PAÉZ, R. et al. Effect of heat treatment and spray drying on lactobacilli viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v. 48, p. 748-754, 2012.
- PICOT, A.; LACROIX, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 505-515, 2004.
- PINTO, S. S. et al. Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulated by spray drying. **Food Research International**, v. 67, p. 400-408, 2015.
- RAJAM, R.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p.773-780, 2015.
- RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, p. 1-7, 2010.
- RODRIGUES, D. et al. Influence of L-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 869-876, 2011.
- SCHELL D.; BEERMANN, C. Fluidized bed microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* with sweet whey and shellac for improved acid resistance and in-vitro gastro-intestinal survival. **Food Research International**, v. 62, p. 308-314, 2014.
- SHEU, T. Y.; MARSHALL, R. T.; HEYMANN, H. Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1902-1907, 1993.
- Silva, J. et al. Spray-drying for the production of dried cultures. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, v. 321-335, 2011.
- SIMPSON, P. J. et al. Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 493-501, 2005.

- SMITHERS, G.W. Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 695-704, 2008.
- SOUKOULIS, C. et al. Impact of milk protein type on the viability and storage stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 using spray drying. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 1255-1268, 2014.
- SOUZA, R. R. et al. Recovery and purification of lactose from whey. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 49, p. 1137-1143, 2010.
- TRABELSI, I. et al. Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved the survival of newly probiotic in oxgall and gastric juice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 61, p. 36-42, 2013.
- TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 225-241, 2014.
- VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 497-505, 1999.
- WADA, T. et al. Physicochemical characterization and biological effects of inulin enzymatically synthesized from sucrose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1246-1253, 2005.
- YONEKURA, L. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 205-214, 2014.

CAPÍTULO 4 - EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE *BIFIDOBACTERIUM* BB-12 MICROENCAPSULADA COM SORO DE LEITE E INULINA NAS PROPRIEDADES DE IOGURTE TIPO GREGO

RESUMO

O efeito da aplicação de *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada por *spray drying* com soro de leite e inulina nas propriedades microbiológicas, físico-químicas, de textura e de cor de iogurte tipo grego foi avaliado durante 28 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C. A sobrevivência do probiótico em condições gastrointestinal simuladas foi avaliada ao final do período de armazenamento. Foram produzidas três formulações de iogurte tipo grego: Controle (com células livres); SW (com microcápsulas produzidas somente com soro de leite); e SWI (com microcápsulas produzidas com soro de leite e inulina). As contagens de *Bifidobacterium* BB-12 nos iogurtes Controle e SW permaneceram estáveis durante o armazenamento, enquanto que uma pequena redução ocorreu no iogurte SWI. No entanto, a adição das microcápsulas melhorou a sobrevivência de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* no iogurte SW após 14 dias de armazenamento. De modo geral, a incorporação das microcápsulas no iogurte tipo grego afetou propriedades físico-químicas e de textura específicas das amostras. Todas as amostras apresentaram uma redução na sobrevivência do probiótico durante a simulação gastrointestinal; contudo, esta diminuição foi mais pronunciada na amostra SWI. Mesmo que o efeito protetor das microcápsulas não tenha sido evidente, os resultados demonstraram que o iogurte tipo grego é um alimento promissor para incorporação de *Bifidobacterium* BB-12.

Palavras-chave: Probiótico. Microencapsulação. Soro de leite. Prebiótico. Iogurte probiótico. Simulação gastrointestinal *in vitro*.

Effect of the incorporation of *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulated with sweet whey and inulin on the properties of Greek-style yogurt

ABSTRACT

The effect of the addition of *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulated by spray drying with sweet whey and inulin on the microbiological, physicochemical, texture and color properties of Greek-style yogurt was evaluated during 28 days of storage at 4 ± 1 °C. The survival of probiotic under simulated gastrointestinal conditions was assessed after storage time. Three formulations of Greek-style yogurt were produced: Control (with free cells); SW (with microcapsules produced only with sweet whey); and SWI (with microcapsules produced with sweet whey and inulin). The *Bifidobacterium* BB-12 counts remained stable during storage in the Control and SW yogurts, while a slight decrease occurred in the SWI yogurt. Nevertheless, the addition of microcapsules improved the survival of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* in the SW yogurt after 14 days of storage. In general, incorporation of microcapsules into Greek-style yogurt affected specific physicochemical and textural properties of the samples. Decreasing probiotic survival during gastrointestinal simulation was observed for all samples; however, it was more pronounced in the SWI yogurt. Even though the protective effect of microcapsules was not evident, the results demonstrated that Greek-style yogurt is a promising carrier for incorporation of *Bifidobacterium* BB-12.

Keywords: Probiotic. Microencapsulation. Whey. Prebiotic. Probiotic yogurt. *In vitro* simulated gastrointestinal.

1. INTRODUÇÃO

Os probióticos são conhecidos por proporcionar uma série de potenciais benefícios à saúde, uma vez que eles auxiliam na manutenção do equilíbrio e composição do trato intestinal, protegendo o organismo humano contra a invasão de patógenos (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010). No entanto, para que estes benefícios sejam alcançados, a manutenção da concentração adequada de microorganismos viáveis no produto durante a estocagem é muito importante. Assim, a literatura recomenda que o número de células probióticas viáveis no produto seja superior a $6 \log \text{ UFC g}^{-1}$ até o final de sua vida

útil (TRIPATHI; GIRI, 2014). Além de disso, depois de ingeridos, os probióticos ainda devem ser capazes de resistir à passagem através do trato gastrointestinal, garantindo sua eficácia no organismo (WÜRTH et al., 2015).

O gênero *Bifidobacterium* encontra-se entre os mais comumente empregados como probióticos e diversas espécies deste gênero têm sido incorporadas em derivados lácteos (PRASANNA; GRANDISON; CHARALAMPOPOULOS, 2014). Iogurtes e demais leites fermentados são considerados os alimentos mais popularmente utilizados como carreadores de probióticos, principalmente em virtude de sua grande aceitação pelos consumidores e excelente valor nutricional (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001; De CASTRO et al., 2009; GRANATO et al. 2010). O iogurte grego ou iogurte concentrado, conhecido como *strained yogurt* na Europa, é um produto semissólido tradicionalmente obtido pela drenagem do soro de leite ácido do iogurte até que se atinja o teor de sólidos totais desejados (DESAI; SHEPARD; DRAKE, 2013; BONG; MORARU, 2014). Devido ao seu alto teor de sólidos totais, o iogurte tipo grego pode ser uma matriz adequada para incorporação de bactérias probióticas (ABD EL-SALAM et al., 2011). Entretanto, vários fatores podem influenciar a sobrevivência de culturas em iogurtes, os quais incluem interações com as culturas iniciadoras, pH, concentrações de metabólitos, níveis de oxigênio e peróxido de hidrogênio dissolvidos e condições de armazenamento (TALWALKAR; KAILASAPATHY, 2004; NG et al. 2011).

A utilização da microencapsulação surgiu como uma alternativa para a proteção de probióticos e diversas pesquisas tem aplicado esta técnica com a finalidade de melhorar a sobrevivência destes microorganismos em iogurtes e também durante a passagem pelo trato gastrointestinal (SHOJI et al., 2013; LI et al., 2014; MOUSA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2014). Dentre as técnicas de microencapsulação, a de *spray drying* é uma das mais convenientes em termos de requerimento energético, custo e rendimento, sendo que os danos causados às células devido ao emprego das altas temperaturas podem ser minimizados pela adequada seleção das condições de operação e da composição do meio de alimentação (AVILA-REYES et al., 2014; YONEKURA et al., 2014). Com relação aos biopolímeros aplicados como agentes encapsulantes, o soro de leite tem se mostrado eficaz, melhorando a sobrevivência de bactérias probióticas durante o processo de *spray drying* e em condições gastrointestinais (JANTZEN; GÖPEL; BEERMANN, 2013; MACIEL et al., 2014). Em um trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa foi verificado que a bactéria

Bifidobacterium BB-12 microencapsulada por *spray drying* utilizando soro de leite na forma líquida resistiu melhor quando exposta a condições gastrointestinais simuladas do que as células na forma livre (PINTO et al., 2015b). Além disso, com o intuito de melhorar a eficácia dos probióticos microencapsulados, agentes prebióticos como a inulina têm sido aplicados com sucesso, em conjunto com outros polímeros, como agentes encapsulantes (FRITZEN-FREIRE et al, 2013b; KRASAEKOOPT, W.; WATCHARAPOKA, 2014).

Contudo, até o momento, não existem estudos com iogurte tipo grego adicionado de bactérias probióticas microencapsuladas. Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver um iogurte tipo grego adicionado de *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada com soro de leite e inulina por *spray drying*, assim como avaliar o efeito da adição das microcápsulas nas propriedades microbiológicas, físico-químicas, de textura e cor durante 28 dias de armazenamento do produto a 4 ± 1 °C. Também foi avaliada a sobrevivência da bactéria probiótica na forma livre e microencapsulada no produto durante a exposição a condições gastrointestinais simuladas, após 28 dias de armazenamento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Cultura probiótica contendo *Bifidobacterium* BB-12 (BB-12[®], Chr. Hansen, Hønsholm, Dinamarca) foi utilizada como material ativo nas microcápsulas, enquanto que leite em pó desnatado (Molico[®], Nestlé, São Paulo, Brasil) foi empregado na preparação da suspensão de bactérias. Os agentes encapsulantes utilizados foram soro de leite líquido e o prebiótico inulina (Orafti[®] HPX, Beneo, Tienen, Bélgica), com grau de polimerização (DP) ≥ 23 . O soro de leite foi obtido como descrito por Pinto et al. (2015a). Agar MRS (Difco, Sparks, MD, EUA), agar M17 (Fluka, Buchs, Suíça), cloreto de lítio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), propionato de sódio (Fluka, Buchs, Suíça) e AnaeroGen[®] (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) foram empregados na realização das análises microbiológicas. Pepsina da mucosa estomacal de suínos (EC 3.4.23.1) (≥ 400 U/mg proteína), α -amilase de *Aspergillus oryzae* (EC 3.2.1.1) (28,75 U/mg proteína), pancreatina de pâncreas de suínos (8 x especificação USP) e sais biliares utilizados para simulação das condições gastrointestinais foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os ingredientes comerciais utilizados na produção do iogurte tipo gregos foram: leite pasteurizado padronizado (3 g 100 g⁻¹

gordura, Tirol[®], Treze Tílias, SC, Brasil), leite em pó desnatado (Molico[®], Nestlé, São Paulo, Brasil), açúcar (Caravelas[®], Ariranha, SP, Brasil) e cultura láctica mista de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YF-L812 (Chr. Hansen, Valinhos, SP, Brasil). Todos os demais reagentes empregados foram de grau analítico (p.a.).

2.2 Preparo da suspensão de células probióticas

O preparo da suspensão de células foi realizado de acordo com os procedimentos descritos por Fritzen-Freire et al. (2012). Cultura pura e liofilizada DVS de *Bifidobacterium* BB-12[®] foi reidratada na concentração de 25 g L⁻¹ em uma solução estéril de leite em pó desnatado reconstituído (Molico[®], Nestlé, São Paulo, Brasil) (120 g L⁻¹) e congelada em frascos estéreis a -20 ± 1 °C. Antes de ser inoculada nas soluções de alimentação do *spray drying* ou diretamente empregada como células livres (iogurte Controle) a cultura estoque foi reativada em estufa a 37 ± 1 °C por duas horas.

2.3 Preparo das soluções de alimentação e microencapsulação

As soluções de alimentação utilizadas na produção das microcápsulas contendo *Bifidobacterium* BB-12 foram preparadas somente com soro de leite ou com soro de leite e inulina (100 g L⁻¹). Os meios foram homogeneizados e tratados termicamente a 80 ± 1 °C por 30 min. Antes da adição da suspensão de células probióticas, as soluções de alimentação foram resfriadas até temperatura ambiente. Após, cultura estoque (10,40 log UFC g⁻¹) foi inoculada nas duas soluções de alimentação na concentração de 50 mL L⁻¹.

A microencapsulação do probiótico foi realizada em *spray dryer* de escala laboratorial (Buchi B-290 mini spray dryer, Flawil, Switzerland), operado com temperatura de entrada de ar de 150 °C e temperatura de saída de ar 50 ± 3 °C. As soluções de alimentação contendo *Bifidobacterium* BB-12 foram mantidas sob agitação e introduzidas na câmara de secagem utilizando uma bomba peristáltica com vazão de alimentação de 6 mL.min⁻¹, taxa de fluxo do ar de secagem de 35 m³.h⁻¹ e pressão do ar de 0,7 MPa. Após o processo de *spray drying*, as microcápsulas foram coletadas na base do ciclone, transferidas para frascos plásticos estéreis e armazenadas a -20 ± 1 °C.

2.4 Fabricação do iogurte tipo grego

Leite comercial pasteurizado foi adicionado de açúcar (50 g L^{-1}) e leite em pó desnatado (10 g L^{-1}), submetido a tratamento térmico a $90 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min e subsequentemente resfriado até $42 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho de gelo. O iogurte foi produzido através da inoculação da mistura com cultura YF-L812, previamente preparada de acordo com as recomendações do fabricante, seguida de incubação a $42 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. A fermentação do iogurte foi interrompida quando o pH atingiu 4,6. O iogurte foi resfriado até $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e mantido nesta temperatura por 12 horas. Após este período o iogurte foi transferido para dessoradores, sendo drenado sob-refrigeração ($4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) por 18 horas, como proposto por Şanlıdere Aloğlu e Öner (2013). O iogurte drenado foi batido e dividido em três porções nas quais a bactéria probiótica, na forma livre ou microencapsulada, foi adicionada. A uma das porções, denominada iogurte Controle, foi adicionado $4,0 \text{ mL kg}^{-1}$ da suspensão de células de bifidobactéria (células livres), enquanto que nas outras duas porções (SW e SWI) foram adicionados $10,0 \text{ g kg}^{-1}$ das diferentes formulações de microcápsulas. O iogurte SW foi adicionado das microcápsulas produzidas somente com soro de leite e o iogurte SWI foi adicionado das microcápsulas produzidas com soro de leite e inulina. Os produtos obtidos foram acondicionados em potes plásticos de 100 mL, selados com tampas de folha de alumínio, e armazenados a $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Foram realizadas três repetições do experimento.

A caracterização físico-química das amostras de iogurte tipo grego foi realizada no dia 1 de armazenamento, enquanto que as análises microbiológicas, teor de sólidos totais, pH, acidez titulável, textura e cor foram realizadas nos dias 1, 14 e 28 de armazenamento a $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. A sobrevivência do probiótico nos iogurtes em condições gastrointestinais simuladas foi avaliada após 28 dias de armazenamento ($4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$).

2.5 Análises microbiológicas

Para a realização das análises microbiológicas, 25 g de iogurte foram diluídas em 225 mL de tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0) e homogeneizadas em agitador magnético durante 10 min para liberação do probiótico das microcápsulas. O mesmo procedimento foi realizado para o iogurte contendo bifidobactéria na forma livre, com o intuito de manter as mesmas condições de análise. As amostras foram submentidas a diluições seriadas utilizando água peptonada (1 g L^{-1}) e as bactérias foram enumeradas por plaqueamento em profundidade.

A enumeração de *Bifidobacterium* BB-12 foi realizada utilizando agar MRS modificado com adição de 2 g L⁻¹ de cloreto de lítio e 3 g L⁻¹ de propionato, como proposto por Vinderola e Reinheimer (1999). As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose contendo AnaeroGen[®] a 37 ± 1 °C for 72 h. As colônias de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* foram enumeradas utilizando agar MRS com sobrecamada e as placas foram incubadas em condições aeróbias a 37 ± 1 °C for 72 h (DAVE; SHAH, 1996). A enumeração de *S. thermophilus* foi realizada utilizando agar M17 acrescido de solução estéril de lactose (100 g L⁻¹) e as placas foram incubadas em condições aeróbias a 37 ± 1 °C for 48 h (IDF, 1997). Após os respectivos períodos de incubação, a contagem de células viáveis probióticas e das culturas iniciadoras foi realizada e expressa em log unidade formadora de colônia por grama (log UFC g⁻¹). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.6 Análises físico-químicas

Os iogurtes foram analisados quanto aos teores de sólidos totais (g 100 g⁻¹), através de secagem em estufa a 105 °C até peso constante, e lipídios (g 100 g⁻¹) por extração em Soxhlet, segundo o Manual de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). O teor de proteínas (g 100 g⁻¹) foi estimado através do teor de nitrogênio total obtido pelo método de Kjeldahl (N x 6,38) e o teor de cinzas (g 100 g⁻¹) determinado através de incineração da amostra a em mufla a 550 °C (AOAC, 2005). O pH foi medido utilizando pHmetro de bancada (modelo W3B, BEL Engineering, Piracicaba, SP, Brasil), enquanto que a acidez titulável foi determinada segundo a AOAC (2005).

2.7 Análise instrumental de textura

Os parâmetros de textura foram determinados utilizando um texturômetro modelo TA-XT *plus* (Stable Micro Systems, Texture Exponent software, Surrey, Reino Unido) equipado com célula de carga de 50 kg. Um teste de dupla compressão foi aplicado nas amostras de iogurte (50 mm de diâmetro e 20 mm de altura) contidas em potes plásticos individuais utilizando um probe cilíndrico de 25 mm de diâmetro. As medidas foram efetuadas a 4 ± 1 °C, com profundidade de penetração de 10 mm no centro geométrico da amostra e velocidade de 1,0 mm s⁻¹. Os dados de força (N) em função do tempo (s) foram obtidos utilizando o *software* Texture Exponent 32 versão 4.0.13.0 (Stable Micro Systems). Os parâmetros obtidos foram: firmeza,

coesividade, adesividade (N.s) e gomosidade (N). Para cada amostra de iogurte os resultados foram expressos como média de seis medidas.

2.8 Análise de cor

A análise de cor das amostras de iogurte foi realizada utilizando um colorímetro (Minolta Chroma Meter CR- 400, Konica Minolta, Osaka, Japan), ajustado para operar com iluminante D65 e ângulo de observação de 10° e previamente calibrado. A escala CIELab foi empregada para calcular os valores dos parâmetros L*, a* e b*, onde o parâmetro L* representa a luminosidade que varia de preto (0) para branco (100), a* representa a variação da coloração da amostra de vermelho (+) para verde (-) e b* representa a variação da coloração de amarelo (+) para azul (-). Para cada amostra de iogurte os resultados foram expressos como média de seis medidas.

2.9 Sobrevivência de *Bifidobacterium* BB-12 em condições gastrointestinais simuladas

A avaliação sobrevivência da bifidobactéria nos iogurtes durante a exposição a condições gastrointestinais simuladas foi realizada segundo metodologia descrita por Verruck et al. (2015). A viabilidade do probiótico foi avaliada sequencialmente em condições que simulam as diferentes seções do trato gastrointestinal humano (boca, esôfago/estômago, duodeno e íleo). Todas as soluções de enzimas foram preparadas no momento de sua utilização, esterilizadas por filtração utilizando membrana filtrante de 0,22 µm (MF-Millipore, Billerica MA, EUA) e mantidas em banho de gelo durante todo período de simulação. As amostras de iogurte (25 g) foram colocadas em frascos estéreis e um banho com agitação (Dist DI950M, Florianópolis SC, Brasil) a 37 ± 1 °C foi utilizado para simular a temperatura e os movimentos peristálticos característicos do trato gastrointestinal humano. Para a etapa de simulação da mastigação (boca), o pH foi ajustado para 6,9 com solução 1 mol L⁻¹ de NaHCO₃ e uma solução de CaCl₂ (1 mmol L⁻¹) contendo α-amilase (100 U mL⁻¹) foi adicionada a uma taxa de 0,6 mL min⁻¹ por 2 min, com agitação de 200 rpm. Na etapa do esôfago/estômago o pH foi reduzido gradualmente para 2,0 com solução de HCl 1 mol L⁻¹. Durante toda a etapa gástrica, 0,05 mL de solução de pepsina (25 mg mL⁻¹ em HCl 0,1 mol L⁻¹) foram adicionados em alíquotas iguais, totalizando 90 minutos com agitação de 130 rpm. Para simular a etapa do duodeno o pH foi aumentado para 5,0 pela adição de

NaHCO₃ 1 mol L⁻¹. Em seguida, 0,25 mL de uma solução pancreatina/sais de bile (2 g L⁻¹ de pancreatina e 12 g L⁻¹ de sais biliares em NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹) foram adicionados por grama de amostra, com agitação de 45 rpm por 20 min. Por fim, para a etapa de simulação do íleo, o pH foi aumentado para 6,5 pela adição de NaHCO₃ 1 mol L⁻¹ mantendo-se a agitação em 45 rpm por 90 min. Ao final de cada etapa, a sobrevivência da bifidobactéria foi avaliada através da enumeração de células viáveis, conforme descrito na seção 2.5. Uma vez que a simulação das condições gastrointestinais foi realizada de forma contínua o volume de trabalho foi aumentando gradualmente. Assim, a diluição de cada amostra foi corrigida com água peptonada (1 g L⁻¹) até atingir 225 mL por 25 g de iogurte.

2.10 Análise estatística

Os dados foram tratados utilizando o *software* STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA). Análise de variância (ANOVA) foi aplicada para determinar a existência de diferença ($p < 0,05$) entre os resultados e o teste de Tukey foi aplicado como teste de comparação de médias. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises microbiológicas

As contagens de células viáveis de *Bifidobacterium* BB-12, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* nas amostras de iogurte durante 28 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C estão apresentadas na Figura 4.1. Todas as formulações de iogurte apresentaram contagem de células viáveis de *Bifidobacterium* BB-12 superior a 9 log UFC g⁻¹ ao longo do armazenamento, indicando que o iogurte tipo grego proporcionou um ambiente adequado para a sobrevivência da bactéria probiótica. As contagens de *Bifidobacterium* BB-12 nas amostras Controle e SW permaneceram estáveis ($p > 0,05$) durante todo o período de estocagem. Contudo, foi observada uma pequena diminuição ($p < 0,05$) na contagem de *Bifidobacterium* BB-12 durante os 28 dias de armazenamento do iogurte SWI. Este comportamento provavelmente está relacionado com as diferentes características químicas das soluções de alimentação do *spray drying*. Diversos estudos mostraram que diferentes agentes encapsulantes fornecem diferentes graus de proteção aos micro-organismos probióticos submetidos à operação de *spray*

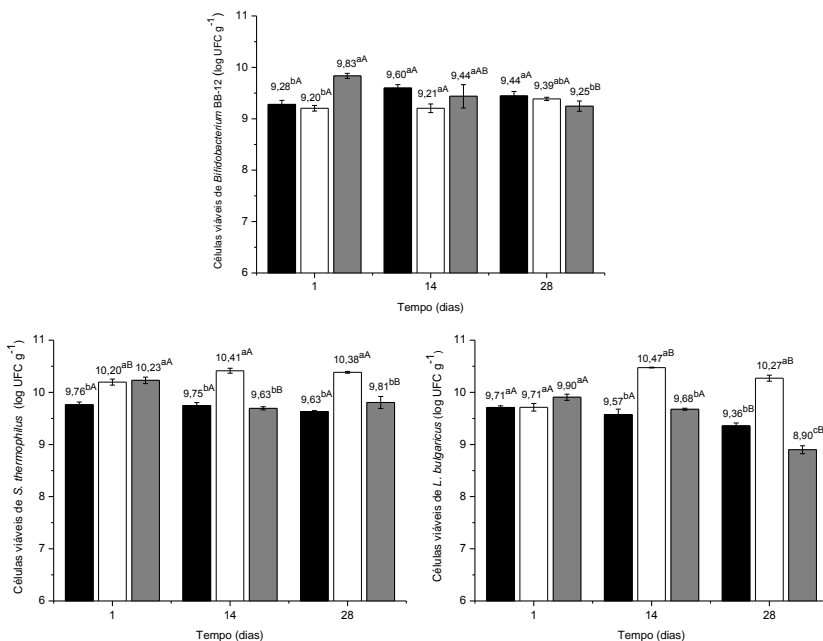
drying, tanto durante a estocagem das microcápsulas (YONEKURA et al., 2014; RAJAM; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2015) como quando estas foram incorporadas em alimentos (FRITZEN-FREIRE et al., 2013b).

A alta sobrevivência da bifidobactéria observada neste trabalho pode ser atribuída ao tipo de cepa probiótica empregada e também as características intrínsecas do produto. Segundo Ranadheera, Baines e Adams (2010) a sobrevivência de micro-organismos probióticos em alimentos está intimamente relacionada com as suas propriedades (concentração e tipo de proteína, teor de lipídios, nível de oxigênio dissolvido, pH, entre outros) e também com as condições de armazenamento. De acordo com Mohammadi, Sohravandi e Mortazavian (2012) os principais fatores que afetam a estabilidade de bactérias probióticas em alimentos fermentados são os baixos valores de pH e a acidez titulável. No entanto, os valores de pH e acidez titulável obtidos neste estudo (Tabela 4.2) aparentemente não influenciaram a viabilidade da bactéria probiótica. Um comportamento similar foi verificado por Abd El-Salam et al. (2011), que observaram que as contagens de *L. acidophilus* e de *L. casei* adicionados em *labneh* permaneceram altas (acima de 8 log UFC g⁻¹) durante o período de armazenamento do produto. Neste caso, os autores sugeriram que a alta viabilidade dos probióticos adicionados poderia estar relacionada com o alto teor de sólidos totais do produto.

Com relação ao número de células viáveis de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* (Figura 4.1), todas as formulações de iogurte atenderam os padrões exigidos pela legislação brasileira, a qual estabelece que a contagem total de bactérias lácteas deve ser superior a 7 log UFC g⁻¹ no produto durante toda sua vida útil (BRASIL, 2007). As contagens de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* foram significativamente afetadas pela adição das microcápsulas no iogurte tipo grego. A viabilidade de *S. thermophilus* foi maior ($p < 0,05$) nos iogurtes adicionados das microcápsulas (SW e SWI) no dia 1 de armazenamento. O mesmo comportamento foi verificado por Ribeiro et al. (2014) em iogurtes batidos adicionados de *L. acidophilus* LA-5 microencapsulado com pectina e proteínas do soro de leite. Além disso, o iogurte SW (adicionado de microcápsulas produzidas somente com soro de leite) apresentou um ligeiro aumento ($p < 0,05$) nas contagens de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* após 14 dias de estocagem. Uma vez que a maior parte dos sólidos do soro de leite é construída por lactose e por proteínas solúveis (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006), este aumento na viabilidade das culturas iniciadoras pode estar relacionado

com disponibilidade de nutrientes provenientes do soro. Pescuna et al. (2008) relataram que cepas de *S. thermophilus* e *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* foram capazes de reduzir a concentração de lactose em soro de leite reconstituído e também de degradar a β -lactoglobulina, principal proteína do soro. Por outro lado, foi observada uma diminuição na contagem de células viáveis de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* no iogurte SWI (adicionado de microcápsulas produzidas somente com soro de leite e inulina) ao longo do período de armazenamento. Este comportamento está de acordo com o encontrado por Paseephol e Sherkat (2009), que verificaram que a suplementação de iogurtes probióticos com inulina não melhorou a viabilidade de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* em comparação ao iogurte controle.

Figura 4.1: Contagens de células viáveis de *Bifidobacterium* BB-12, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* nas amostras de iogurte tipo grego contendo *Bifidobacterium* BB-12 na forma livre ou microencapsulada durante o armazenamento a 4 ± 1 °C. ■ Controle: iogurte adicionado de bifidobactéria na forma livre; □ SW: iogurte adicionado de bifidobactéria microencapsulada com soro de leite; ▒ SWI: iogurte adicionado de bifidobactéria microencapsulada com soro de leite e inulina. ^{a-c} Letras minúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras no mesmo período de armazenamento. ^{A-D} Letras maiúsculas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os períodos de armazenamento para a mesma amostra.



3.2 Análises físico-químicas

A Tabela 4.1 apresenta os resultados referentes à caracterização físico-química das amostras de iogurte tipo grego. A adição das microcápsulas não alterou ($p > 0,05$) o teor de proteínas e lipídios dos iogurtes. No entanto, os iogurtes adicionados das microcápsulas (SW e SWI) apresentaram maior teor de sólidos totais e cinzas ($p < 0,05$) do que o iogurte Controle. Um aumento no teor de sólidos totais também foi verificado por Pinto et al. (2012) e por Fritzen-Freire et al. (2013) em *frozen* iogurte e creme de ricota, respectivamente, ambos adicionados de

microcápsulas contendo bifidobactéria produzidas com leite em pó desnatado reconstituído e inulina. O iogurte SW foi o que apresentou maior teor de cinzas ($p < 0,05$), seguido pelo iogurte SWI. Este resultado pode ser atribuído à composição das microcápsulas adicionadas no iogurte SW, as quais foram produzidas somente com soro de leite.

Tabela 4.1: Caracterização físico-química das amostras de iogurte tipo grego adicionadas de *Bifidobacterium* BB-12 livre ou microencapsulada no dia 1 de armazenamento ($4 \pm 1^\circ\text{C}$).

Análise (g 100 g ⁻¹ de iogurte)	Amostras de iogurte*		
	Controle	SW	SWI
Sólidos Totais	20,98 ± 0,36 ^b	21,82 ± 0,09 ^a	21,89 ± 0,07 ^a
Proteínas	6,75 ± 0,08 ^a	6,80 ± 0,02 ^a	6,83 ± 0,11 ^a
Lipídios	6,50 ± 0,00 ^a	6,46 ± 0,11 ^a	6,50 ± 0,04 ^a
Cinzas	0,71 ± 0,02 ^c	0,88 ± 0,00 ^a	0,82 ± 0,00 ^b

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). ^{a-c} Letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras. *Controle: iogurte adicionado de bifidobactéria na forma livre; SW: iogurte adicionado de bifidobactéria microencapsulada com soro de leite; SWI: iogurte adicionado de bifidobactéria microencapsulada com soro de leite e inulina.

Os resultados de pH, acidez titulável e teor sólidos totais dos iogurtes durante o armazenamento estão mostrados na Tabela 4.2. Todas as amostras apresentaram um declínio nos valores de pH com concomitante aumento da acidez, sendo mais pronunciados após 14 dias de estocagem. De acordo com Beal et al. (1999), esta redução dos valores de pH ao longo do armazenamento está relacionada com a pós-acidificação do produto que ocorre devido a contínua produção de ácido láctico e outros ácidos orgânicos resultantes do consumo da lactose pelas culturas iniciadoras e probiótica.

Tabela 4.2: Valores de pH, acidez titulável e sólidos totais das amostras de iogurte tipo grego adicionadas de *Bifidobacterium* BB-12 livre ou microencapsulada durante 28 dias de armazenamento ($4 \pm 1^\circ\text{C}$).

Análise	Dias	Amostras de iogurte*		
		Controle	SW	SWI
pH	1	4,21±0,01 ^{cA}	4,30±0,02 ^{aA}	4,27±0,01 ^{bA}
	14	4,05±0,01 ^{cC}	4,10±0,01 ^{bC}	4,14±0,01 ^{aC}
	28	4,08±0,01 ^{cB}	4,13±0,01 ^{bB}	4,16±0,01 ^{aB}
Acidez titulável (g ácido láctico 100 g ⁻¹)	1	1,08±0,00 ^{cB}	1,11±0,02 ^{bB}	1,14±0,01 ^{aB}
	14	1,26±0,02 ^{aA}	1,25±0,02 ^{aA}	1,19±0,00 ^{bA}
	28	1,24±0,01 ^{aA}	1,24±0,01 ^{aA}	1,18±0,02 ^{bA}
Sólidos totais (g 100 g ⁻¹)	1	20,98±0,36 ^{bB}	21,82±0,09 ^{aB}	21,89±0,07 ^{aB}
	14	21,77±0,03 ^{bAB}	22,69±0,05 ^{aA}	22,83±0,01 ^{aA}
	28	22,05±0,02 ^{bA}	22,84±0,23 ^{aA}	22,97±0,02 ^{aA}

Resultados expressos como média \pm desvio padrão (n=3). ^{a-c} Letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras no mesmo período de armazenamento. ^{A-D} Letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os períodos de armazenamento para a mesma amostra. *Controle: iogurte adicionado de bifidobactéria na forma livre; SW: iogurte adicionado de bifidobactéria microencapsulada com soro de leite; SWI: iogurte adicionado de bifidobactéria microencapsulada com soro de leite e inulina.

Os iogurtes adicionados das microcápsulas (SW e SWI) apresentaram maiores ($p < 0,05$) valores de pH no início do armazenamento do que o iogurte contendo células livres (Controle). Por outro lado, a acidez dos iogurtes SW e SWI foi maior ($p < 0,05$) que o do iogurte Controle no dia 1 de armazenamento. Contudo, o decréscimo do pH e aumento da acidez ao longo do armazenamento foram menos pronunciados no iogurte SWI. Estes resultados indicam que a adição das microcápsulas produzidas com soro de leite e inulina conduziu a uma menor pós-acidificação do iogurte, independente dos valores de pH e acidez titulável observados no início da estocagem. Shoji et al. (2013), Li et al. (2014) e Ribeiro et al. (2014) observaram que iogurtes adicionados de probióticos microencapsulados apresentaram menor pós-acidificação quando comparado aos que continham probióticos adicionados na forma livre. No entanto, neste trabalho, este comportamento não foi observado no iogurte adicionado de microcápsulas produzidas somente como soro de leite (SW). Tal resultado pode estar associado a maior viabilidade das culturas de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* nesta amostra (Figura 4.1). Shah et al.

(1995) relataram que as culturas iniciadoras do iogurte continuam ativas mesmo em temperaturas de refrigeração, sendo ainda capazes de fermentar a lactose e convertê-la em ácido láctico, o que pode explicar a maior pós-acidificação observada no iogurte SW.

Todas as amostras apresentaram um pequeno aumento no teor de sólidos durante os 28 dias de armazenamento ($p < 0,05$) (Tabela 4.2). Este aumento provavelmente ocorreu devido à formação de gotículas de líquido nos selos de alumínio, demonstrando que ocorreu expulsão de água do produto durante o armazenamento. Abd El-Salam et al. (2011) sugeriram que o aumento do teor de sólidos totais em *labneh* durante a estocagem poderia estar relacionada com a sinerese das amostras induzida pelo aumento da acidez do produto.

3.3 Análise instrumental de textura

Os parâmetros de textura obtidos para as amostras de iogurte tipo grego estão mostrados na Tabela 4.3. Durante o período de armazenamento foi verificado um aumento ($p < 0,05$) nos parâmetros de firmeza, adesividade e gomosidade de todas as amostras. Este aumento provavelmente está associado ao aumento no teor de sólidos totais observado ao longo da estocagem (Tabela 4.2). Em contrapartida, as amostras apresentaram uma diminuição ($p < 0,05$) da coesividade. A coesividade mede a capacidade do produto de resistir a uma segunda deformação com relação a uma primeira deformação, estando relacionada com a força de interação entre as ligações do gel (LIU; CHIEN; KUO, 2013). Assim, a redução dos valores de coesividade pode indicar uma redução nas interações proteína-proteína após 14 dias de armazenamento. Tais mudanças nos parâmetros de textura também foram observadas por Bedani et al. (2013) em iogurtes de soja probióticos com adição de inulina e/ou farinha de *okara* ao longo do armazenamento dos produtos.

A adição das microcápsulas produzidas somente com soro de leite reduziu a firmeza e a gomosidade (parâmetro derivado da firmeza) do iogurte SW em comparação às demais amostras. Oliveira et al. (2001) e Amatayakul, Sherkat e Shah (2006) correlacionaram a diminuição da firmeza de iogurtes com um menor teor de sólidos totais e/ou proteínas do produto e também com o tipo de proteína presente. Entretanto, neste estudo, o teor de sólidos do iogurte SW foi ligeiramente maior que o do iogurte Controle (Tabela 4.1), o que não poderia ter resultado em uma menor firmeza do produto. Além disso, as amostras não apresentaram diferença significativa com relação ao teor

de proteínas (Tabela 4.1). Dessa forma, os menores valores de firmeza observados no iogurte SW podem estar associados com a redução da razão caseínas/proteínas do soro, causada pela presença do soro de leite na constituição das microcápsulas. Amatayakul et al. (2006) verificaram que a diminuição da razão caseínas/ proteínas do soro em iogurte firme produzido com diferentes concentrações de proteína concentrada do soro provocou uma redução da firmeza do produto final. Por outro lado, a adição das microcápsulas produzidas com soro de leite e inulina não modificou a firmeza das amostras, uma vez que não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os iogurtes Controle e SWI durante todo o período de armazenamento. De acordo com Meyer et al. (2011) o efeito da inulina na textura depende da concentração adicionada, sendo fortemente influenciado pela composição e estrutura da matriz láctea.

Tabela 4.3: Parâmetros de textura das amostras de iogurte tipo grego adicionadas de *Bifidobacterium* BB-12 livre ou microencapsulada durante 28 dias de armazenamento ($4 \pm 1^\circ\text{C}$).

Parâmetro de textura	Dias	Amostras de iogurte*		
		Controle	SW	SWI
Firmeza (N)	1	1,13±0,04 ^{aC}	1,03±0,02 ^{bC}	1,16±0,03 ^{aC}
	14	1,46±0,03 ^{aB}	1,26±0,03 ^{bB}	1,47±0,03 ^{aB}
	28	1,57±0,08 ^{aA}	1,43±0,09 ^{bA}	1,67±0,08 ^{aA}
Coesividade (-)	1	0,54±0,01 ^{bA}	0,54±0,01 ^{bA}	0,55±0,01 ^{aA}
	14	0,50±0,01 ^{aB}	0,50±0,01 ^{aB}	0,51±0,01 ^{aB}
	28	0,51±0,01 ^{aB}	0,49±0,01 ^{aB}	0,50±0,03 ^{aB}
Adesividade (N s)	1	4,62±0,32 ^{aB}	4,25±0,11 ^{bC}	4,57±0,24 ^{abB}
	14	5,56±0,34 ^{abA}	5,29±0,28 ^{bB}	5,92±0,38 ^{aA}
	28	5,86±0,63 ^{aA}	5,97±0,42 ^{aA}	6,51±0,75 ^{aA}
Gomosidade (N)	1	60,43±2,24 ^{bC}	55,10±0,75 ^{cC}	63,96±1,40 ^{aC}
	14	72,61±2,46 ^{aB}	62,86±1,28 ^{bB}	73,74±1,58 ^{aB}
	28	79,66±4,79 ^{aA}	70,04±4,25 ^{bA}	80,99±0,47 ^{aA}

Resultados expressos como média \pm desvio padrão ($n=6$). ^{a-c} Letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras no mesmo período de armazenamento. ^{A-D} Letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os períodos de armazenamento para a mesma amostra. *Controle: iogurte adicionado de bifidobactéria na forma livre; SW: iogurte adicionado de bifidobactéria microencapsulada com soro de leite; SWI: iogurte adicionado de bifidobactéria microencapsulada com soro de leite e inulina.

3.4 Análise de cor

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nos valores dos parâmetros L^* , a^* e b^* entre as formulações de iogurte e também durante o armazenamento, demonstrando que a adição de *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada não modificou a cor dos iogurtes. Os iogurtes apresentaram altos valores de luminosidade (L^*), variando de 87,03 a 87,63. Além disso, os valores do parâmetro a^* variaram de -3,49 a -3,28, enquanto que os valores do parâmetro b^* variaram de 20,95 a 21,48, indicando uma tendência dos iogurtes às colorações verde e amarela, respectivamente. Os valores observados para parâmetros a^* e b^* provavelmente estão associados à presença dos pigmentos naturais do leite. Segundo Nozière et al. (2006) os principais pigmentos do leite são a riboflavina, um componente de cor verde presente na fase aquosa, e os carotenoides que são responsáveis pela coloração amarela.

3.5 Sobrevivência de *Bifidobacterium* BB-12 em condições gastrointestinais simuladas

A sobrevivência de *Bifidobacterium* BB-12 nos iogurtes submetidos à simulação das condições gastrointestinais após 28 dias de armazenamento (4 ± 1 °C) está apresentada na Tabela 4.4. A contagem de células viáveis diminuiu consideravelmente durante a simulação gastrointestinal, contudo, a resistência do probiótico variou entre as diferentes formulações de iogurte. A contagem de células viáveis manteve-se estável ($p > 0,05$) após a etapa de simulação da mastigação (boca). Como relatado por Verruck et al. (2015), este comportamento pode ser atribuído ao curto tempo de contato da amostra com a enzima α -amilase e também devido a capacidade tamponante da solução de bicarbonato de sódio presente na solução da enzima. No entanto, a sobrevivência da bifidobactéria reduziu substancialmente ($p < 0,05$) após a etapa de simulação do esôfago/estômago em todas as amostras de iogurte, mostrando que o probiótico apresentou grande sensibilidade ao HCl e a pepsina.

Tabela 4.4. Sobrevivência de *Bifidobacterium* BB-12 (log UFC g⁻¹) nas amostras de iogurte tipo grego, armazenadas por 28 dias (4 ± 1°C), durante a exposição às condições gastrointestinais simuladas.

Etapas da simulação	Tempo de amostragem (min)	Amostras de iogurte*		
		Controle	SW	SWI
Inicial	0	9,44 ± 0,09 ^{aA}	9,39 ± 0,03 ^{abA}	9,25 ± 0,10 ^{bA}
Boca (pH 6,9, α-amilase; 200 rpm)	2	9,33 ± 0,11 ^{aA}	9,40 ± 0,18 ^{aA}	9,22 ± 0,02 ^{aA}
Esôfago – Estômago (Δ pH 5,5 para 2,0; pepsina; 130 rpm)	90	6,71 ± 0,19 ^{aB}	5,81 ± 0,04 ^{cB}	6,19 ± 0,04 ^{bB}
Duodeno (Δ pH 2,0 para 5,0; pancreatina + sais de bile; 45 rpm)	110	5,81 ± 0,07 ^{aC}	5,79 ± 0,07 ^{aB}	5,36 ± 0,03 ^{bC}
Íleo (Δ pH 5,0 para 6,5; 45 rpm)	200	5,50 ± 0,05 ^{bC}	5,83 ± 0,04 ^{aB}	5,03 ± 0,11 ^{cD}

^{a-c} Letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras para a mesma etapa da simulação. ^{A-D} Letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as etapas da simulação para a mesma amostra. *Controle: iogurte adicionado de bifidobactéria na forma livre; SW: iogurte adicionado de bifidobactéria microencapsulada com soro de leite; SWI: iogurte adicionado de bifidobactéria microencapsulada com soro de leite e inulina.

A exposição às condições de simulação do esôfago/estômago teve um efeito mais severo nos iogurtes adicionados das microcápsulas. O número de células viáveis nos iogurtes SW e SWI reduziu 3,58 e 3,06 ciclos logarítmicos, respectivamente, em relação à contagem inicial, enquanto que no iogurte contendo células livres (Controle) o número de células viáveis reduziu 2,73 ciclos logarítmicos. Yonekura et al. (2014) relataram que a diminuição da tolerância de probióticos microencapsulados em condições gastrointestinais simuladas pode estar relacionada com injúrias sofridas pelas células durante a operação de *spray drying*, o que pode ter causado variações na tolerância dos probióticos às condições ácidas. Além disto, o fato da simulação ter sido realizada após 28 dias de armazenamento dos iogurtes pode ter contribuído para aumentar ainda mais a suscetibilidade das células probióticas microencapsuladas às condições ácidas, devido a modificações na forma e na estrutura das microcápsulas ao longo da estocagem refrigerada.

Contudo, quando o iogurte SW foi submetido às etapas de simulação do duodeno e do íleo não foram observadas reduções significativas ($p > 0,05$) na contagem de células viáveis de bifidobactéria. Por outro lado, as células presentes nos iogurtes Controle e SWI mostraram-se mais susceptíveis às condições simuladas do duodeno e íleo (saís biliares, pancreatina e aumento do pH), uma vez que o número de células viáveis reduziu 1,21 e 1,16 ciclos logarítmicos, respectivamente, em relação à etapa de simulação do esôfago/estômago. Estes resultados estão de acordo com os encontrados em estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa (PINTO et al., 2015b), no qual verificou-se que a viabilidade de *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada com soro de leite não diminuiu durante as etapas de simulação do duodeno e íleo, nas mesmas condições deste trabalho.

Ao final da simulação gastrointestinal, a sobrevivência de *Bifidobacterium* BB-12 no iogurte SW foi ligeiramente maior ($p < 0,05$) do que no iogurte contendo células livres (Controle). Entretanto, a microencapsulação com soro de leite e inulina não conferiu proteção à bactéria probiótica (iogurte SWI). Tais resultados, apesar de menos favoráveis, também são importantes, pois mostram que nem sempre o emprego da microencapsulação é sinônimo de proteção celular.

Diversas pesquisas (FRITZEN-FREIRE et al., 2013a; SHOJI et al. 2013; MACIEL et al. 2014; KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014) demonstraram o efeito positivo da microencapsulação na proteção de bactérias probióticas expostas a

condições gastrointestinais. Porém, poucos estudos (RIBEIRO et al., 2014; RODRÍGUEZ-HUEZO, 2014) foram realizados com bactérias encapsuladas incorporadas em matrizes alimentares, como no caso deste estudo. Estes trabalhos mostraram que a resistência das bactérias probióticas a condições gastrointestinais simuladas, além de ser dependente da cepa bacteriana, também depende da técnica de microencapsulação, do tipo de agente encapsulante e da matriz alimentar em que são incorporadas.

4. CONCLUSÃO

A viabilidade de *Bifidobacterium* BB-12 manteve-se elevada em todas as amostras de iogurte tipo grego ao longo dos 28 dias de armazenamento, contudo, o efeito protetor da microencapsulação não foi evidenciado. No entanto, o iogurte adicionado das microcápsulas produzidas somente com soro de leite apresentou um aumento na viabilidade de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* durante a estocagem.

De maneira geral, a incorporação das microcápsulas nos iogurtes afetou propriedades específicas em cada amostra. A adição de ambas as formulações de microcápsulas aumentou o teor de sólidos totais e cinzas dos iogurtes, contudo não influenciou a cor dos produtos. A incorporação das microcápsulas produzidas somente com soro de leite provocou uma redução da firmeza e da gomosidade do iogurte, enquanto que a adição das microcápsulas com soro de leite e inulina levou a uma diminuição da pós-acidificação. Entretanto, as microcápsulas produzidas com soro de leite e inulina não foram capazes de conferir proteção à bactéria probiótica durante a exposição às condições gastrointestinais simuladas.

Apesar de este estudo demonstrar que o emprego da microencapsulação nem sempre garante uma maior proteção aos microorganismos, os resultados mostraram que é possível adicionar *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada em iogurte tipo grego, uma vez que as características do produto foram pouco afetadas. Além disso, os resultados das análises microbiológicas indicaram que o iogurte tipo grego é uma matriz alimentícia adequada para incorporação de *Bifidobacterium* BB-12, sendo capaz de manter a viabilidade do microorganismo durante 28 dias de armazenamento ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) do produto.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-SALAM, M. H. et al. Preparation and properties of probiotic concentrated yoghurt (labneh) fortified with conjugated linoleic acid. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, p. 2103-2110, 2011.
- AMATAYAKUL, T.; SHERKAT, F.; SHAH, N. P. Physical characteristics of set yoghurt made with altered casein to whey protein ratios and EPS-producing starter cultures at 9 and 14% total solids. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p.314-324, 2006.
- AMATAYAKUL, T. et al. Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 40-51, 2006.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of the association analytical chemists**. 18th. Edition. Maryland, USA, 2005.
- AVILA-REYES, S. V. et al. Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p.423-430, 2014.
- BEAL, C. et al. Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yoghurt. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 673-681, 1999.
- BEDANI, R. et al. Incorporation of soybean by-product okara and inulin in a probiotic soy yoghurt: texture profile and sensory acceptance. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p.119-125, 2013.
- 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.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA .Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 24 out. 2007. n. 205, Seção 1, p. 4.
- DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Evaluation of Media for Selective Enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*

ssp. *Bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and Bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1529–1536, 1996.

DE CASTRO, F. P. et al. Effect of oligofructose incorporation on the properties of fermented probiotic lactic beverages. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, p. 68-74, 2009.

DESAI, N.T.; SHEPARD, L.; DRAKE, M.A. Sensory properties and drivers of liking for Greek yogurts. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p.7454-7466, 2013.

FRITZEN-FREIRE, C. B et al. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. **Food Research International**, v. 45, p. 306-312, 2012.

FRITZEN-FREIRE, C. B. et al. Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. **LWT- Food Science and Technology** v. 50, p.39-44, 2013a.

FRITZEN-FREITE, C. B. et al. Effect of the application of *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulated by spray drying with prebiotics on the properties of ricotta cream. **Food Research International**, v. 52, p 50-55, 2013b.

GRANATO, D. et al. Probiotic Dairy Products as Functional Foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p.455-470, 2010.

IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ, **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos físico-químicos para análise de alimentos** (4th ed.), Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2008.

IDF. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION STANDARD 117B: 1997. **Enumeration of characteristic microorganisms**. IDF/ISO Standard, 1997. 5p.

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

KRASAEOOPT, W.; WATCHARAPOKA, S. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive

system, yogurt and fruit juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, p.761-766, 2014.

LI, S. et al. *Lactobacillus casei* immobilized onto montmorillonite: Survivability in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration and yogurt. **Food Research International**, v. 64, p. 822-830, 2014.

LIU, H. -H.; CHIEN, J. -T.; KUO, M.-I. Ultra high pressure homogenized soy flour for tofu making. **Food Hydrocolloids**, v. 32, p.278-285, ago. 2013.

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

MACIEL, G. M. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p.1991-1998, 2014.

MEYER, D. et al. Inulin as texture modifier in dairy products. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p.1881-1890, 2011.

MOHAMMADI, R.; SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A. M. The starter culture characteristics of probiotic microorganisms in fermented milks. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, p.399-409, 2012.

MOUSA, A. et al. Evaluation of physiochemical, textural, microbiological and sensory characteristics in set yogurt reinforced by microencapsulated *Bifidobacterium bifidum* F-35. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, p.1673-1679, 2014.

NG, E.W; YEUNG, M.; TONG, P.S. Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 169-175, 2011.

NOZIÈRE, P. et al. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. **Animal Feed Science and Technology**, v. 131, p. 418-450, 2006.

OLIVEIRA, M. N. et al. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, p.935-942, 2001.

PASEEPHOL, T.; SHERKAT, F. Probiotic stability of yoghurts containing Jerusalem artichoke inulins during refrigerated storage. **Journal of Functional Foods**, v. 1, p. 311-318, 2009.

- PESCUMA, M. et al. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. **Food Microbiology**, v. 25, p.442-451, 2008.
- PINTO, S. S. et al. Effects of the addition of microencapsulated *Bifidobacterium* BB-12 on the properties of frozen yogurt. **Journal of Food Engineering**, v. 111, p. 563-569, 2012.
- PINTO, S. S. et al. Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulated by spray drying. **Food Research International**, v. 67, p. 400-408, 2015a.
- PINTO, S. S. et al. Influence of microencapsulation with sweet whey and prebiotics on the survival of *Bifidobacterium* BB-12 under simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p. 1004-1009, 2015b.
- PRASANNA, P. H. P.; GRANDISON, A. S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Bifidobacteria in milk products: An overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits. **Food Research International**, v. 55, p.247-262, 2014.
- RAJAM, R.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Spray freeze drying method for microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Food Engineering**, v. 166, p. 95-103, 2015.
- RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, p. 1-7, 2010.
- RIBEIRO, M. C. E. et al. Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. **Food Research International**, v. 66, p. 424-431, 2014.
- RODRÍGUEZ-HUEZO, M. E. et al. Viability of *Lactobacillus plantarum* entrapped in double emulsion during Oaxaca cheese manufacture, melting and simulated intestinal conditions. **LWT - Food Science Technology**, v. 59, p. 768-739, 2014.
- ŞANLIDERE ALOĞLU, H; ÖNER, Z. The effect of treating goat's milk with transglutaminase on chemical, structural, and sensory properties of labneh. **Small Ruminant Research**, v. 109, p. 31-37, 2013.

SHAH, N. P. et al. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. **International Dairy Journal**, v. 5, n. 5, p. 515-521, 1995.

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

TALWALKAR, A.; KAILASAPATHY, K. A Review of Oxygen Toxicity in Probiotic Yogurts: Influence on the Survival of Probiotic Bacteria and Protective Techniques. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, p. 117-124, 2004.

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

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

VERRUCK, S. et al. The buffalo Minas Frescal cheese as a protective matrix of *Bifidobacterium* BB-12 under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p.1179-1183, 2015.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy science and technology**. 2. ed. Nova York: CRC Press, 2006.

WÜRTH, R. et al. Protective effect of milk protein based microencapsulation on bacterial survival in simulated gastric juice versus the murine gastrointestinal system. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 116-125, 2015.

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

CONCLUSÕES

- Todas as microcápsulas desenvolvidas foram consideradas probióticas, pois apresentaram contagem de células viáveis superior a $6 \log \text{UFC g}^{-1}$ durante os 90 dias de armazenamento, tanto a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ quanto a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. No entanto, a utilização do retentado do soro de leite e a presença dos agentes prebióticos (inulina ou polidextrose) como agentes encapsulantes não influenciaram a viabilidade de *Bifidobacterium* BB-12 e a morfologia das partículas.
- Através da avaliação das propriedades físicas das microcápsulas foi possível verificar que o emprego da inulina como agente encapsulante permitiu a obtenção de partículas com características mais adequadas, tais como menores valores de umidade, atividade de água e higroscopicidade, maior tempo de dissolução em água e em óleo, bem como estabilidade térmica satisfatória.
- A sobrevivência de *Bifidobacterium* BB-12 após o processo de microencapsulação por *spray drying*, assim como após a exposição às condições gastrointestinais simuladas e a diferentes tratamentos térmicos, foi maior nas microcápsulas produzidas somente com soro de leite. Assim, verificou-se que a incorporação dos prebióticos inulina ou polidextrose ao soro de leite não conferiu proteção adicional à bactéria probiótica em condições de estresse.
- O iogurte tipo grego mostrou ser uma matriz alimentícia adequada para incorporação de *Bifidobacterium* BB-12, pois foi capaz de manter a viabilidade da bactéria, tanto na forma livre como microencapsulada, acima de $9 \log \text{UFC g}^{-1}$ durante o armazenamento do produto por 28 dias a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Entretanto, a adição do probiótico na forma microencapsulada não melhorou a viabilidade da bactéria em comparação ao iogurte adicionado de bactéria na forma livre. Por outro lado, a adição das microcápsulas produzidas somente com soro de leite produziu um aumento na contagem de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*.
- A incorporação das microcápsulas no iogurte contribuiu para o aumento dos teores de sólidos totais e de cinzas, porém não influenciou a coloração das amostras. A adição das microcápsulas produzidas somente com soro de leite promoveu uma redução da

firmeza e da gomosidade dos iogurtes, enquanto que a adição das microcápsulas produzidas com soro de leite e inulina conduziu a uma menor pós-acidificação do produto.

- A sobrevivência de *Bifidobacterium* BB-12 após a simulação gastrointestinal foi ligeiramente maior no iogurte adicionado das microcápsulas produzidas somente com soro de leite do que no iogurte contendo bactéria na forma livre. Porém, as microcápsulas produzidas com soro de leite e inulina não conferiram proteção ao probiótico.
- Por fim, o emprego do soro de leite na forma líquida como agente encapsulante de *Bifidobacterium* BB-12 mostrou ser uma alternativa promissora para aproveitamento deste coproduto, auxiliando na redução de problemas relativos ao seu descarte. Além disso, a ampla utilização de soro em pó pelas indústrias de alimentos possibilita que as microcápsulas obtidas sejam aplicadas em diversos produtos alimentícios, entre eles o iogurte tipo grego.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Tabela 5.1: Caracterização físico-química do soro de leite e do retentado do soro obtidos por nanofiltração empregados na produção das microcápsulas.

Análises (g 100 mL ⁻¹)	Amostras	
	Soro de leite	Retentado do soro
Sólidos Totais	6,51 ± 0,02	10,05 ± 0,01
Proteínas	0,77 ± 0,01	1,17 ± 0,02
Lipídios	1,19 ± 0,04	0,65 ± 0,06
Lactose	4,73 ± 0,04	8,12 ± 0,09
Cinzas	0,55 ± 0,01	0,64 ± 0,01

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). As análises foram realizadas empregando metodologia da AOAC (2005).

ANEXOS

ANEXO A – ARTIGO “POTENTIAL USE OF WHEY CONCENTRATE AND PREBIOTICS AS CARRIER AGENTS TO PROTECT *BIFIDOBACTERIUM* BB-12 MICROENCAPSULATED BY SPRAY DRYING” PUBLICADO NO “FOOD RESEARCH INTERNATIONAL” (ISSN: 0963-9969)

Food Research International 67 (2015) 400–408



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres



Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect *Bifidobacterium*-BB-12 microencapsulated by spray drying



Stephanie S. Pinto^a, Carlise B. Fritzen-Freire^b, Silvia Benedetti^c, Fabio S. Murakami^d, José Carlos C. Petrus^c, Elane S. Prudêncio^a, Renata D.M.C. Amboni^{a,*}

^a Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, 88034-001 Florianópolis, SC, Brazil

^b Instituto Federal de Santa Catarina, Rua Euclides Hack, 1603, Bairro Venezia, 89820-000 Xanxerê, SC, Brazil

^c Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Centro Tecnológico, Campus Universitário, Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^d Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmácia, Av. Prof. Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico, 80210-170 Curitiba, PR, Brazil

Acesso do artigo em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996914007522>

ANEXO B – ARTIGO “INFLUENCE OF MICROENCAPSULATION WITH SWEET WHEY AND PREBIOTICS ON THE SURVIVAL OF *BIFIDOBACTERIUM* BB-12 UNDER SIMULATED GASTROINTESTINAL CONDITIONS AND HEAT TREATMENTS”
PUBLICADO NO “LWT - FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY”
(ISSN: 0023-6438)

LWT - Food Science and Technology 64 (2015) 1004–1009



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt



Influence of microencapsulation with sweet whey and prebiotics on the survival of *Bifidobacterium*-BB-12 under simulated gastrointestinal conditions and heat treatments



Stephanie S. Pinto, Silvani Verruck, Cleide R.W. Vieira, Elane S. Prudêncio, Edna Regina Amante, Renata D.M.C. Amboni*

Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, 88034-001, Florianópolis, SC, Brazil

Acesso do artigo em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643815300372>

ANEXO C – TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

10 Slaca

Certificado

Simposio Latino Americano de Ciência de Alimentos
Ciência de Alimentos: Impacto na Nutrição e Saúde

Certificamos que o trabalho intitulado

**PROPRIEDADES FÍSICAS DE MICROCÁPSULAS DE SORO DE LEITE E PREBIÓTICOS
CONTENDO BIFIDOBACTERIA**

de autoria

**Stephanie Silva Pinto, Carlise B. Fritzen-Freire, Tamires Dambros, Lara Felisbino Alves,
Elane Schwinden Prudêncio, Renata Dias de Mello Castanho Amboni**

foi apresentado na SESSÃO de PÓSTER no 10 SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos: "Impacto da Ciência de Alimentos na Nutrição e Saúde", realizado de 3 a 6 de Novembro de 2013, Campinas - São Paulo - Brasil.

Mário Roberto Maróstica Jr.
Dr. Mário Roberto Maróstica Jr.
Coordenador do Comitê de Programação

Gabriela Alves Macedo
Dra. Gabriela Alves Macedo
Coordenadora do Comitê Científico

Dr. Gláucia Maria Pastore
Dra. Gláucia Maria Pastore
Presidente do Evento

0371e981871e1bb694bca8ea11452a4

First International Workshop: Innovation in Food Science

CERTIFICADO

Apresentou o resumo intitulado: ENCAPSULATION YIELD AND VIABILITY DURING STORAGE of Bifidobacterium BB-12 MICROENCAPSULATED BY SPRAY DRYING WITH WHEY AND PREBIOTICS, na forma de PÓSTER, de autoria de Stephanie Silva Pinto; Bianca D'arck de Melo Cavalcante; Lara Felisbino Alves; Gabriela Rodrigues de Liz; Patrícia Mattos de Medeiros; Mariana Takahashi; Elaine Schwinden Prudêncio; Renata Dias de Mello Castanho Amboni, no **First International Workshop Innovation In Food Science**, realizado no dia 16 e 17 de Outubro de 2014, no Mercure Convention Hotel, em Florianópolis- SC.

Roseane Fêtt
Presidente do Evento

Ana Carolina Malsomnave Arisi
Coordenadora do Comitê Científico

Jane Mara Block
Presidente da SBOG

Promoção e realização: Organização:



October 16 - 17th, 2014 • UFSC • Florianópolis • SC • Brazil

XIII ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



Alimentos Inovadores: desafios e oportunidades

XIII ERSCTA

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

Realização



Organização



UITPR

Apoio
Institucional



(PD15) AVALIAÇÃO DA PÓS-ACIDIFICAÇÃO DE IOGURTE TIPO GREGO ADICIONADO DE BIFIDOBACTERIUM BB-12 MICROENCAPSULADA
LUIZA CIRRA PEREIRA (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA), STEPHANIE SILVA PINTO (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA), LARA FELISBINO ALVES (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA), GABRIELA RODRIGUES DE LIZ (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA), STEPHANIE MACHADO STEIN (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA), BIANCA D'ARCK MELO CAVALCANTE (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA), ELANE SCHWINDEN PRUDÊNCIO (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA), RENATA DIAS DE MELLO CASTANHO AMBONI (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

foi apresentado no XIII Encontro Regional Sul de Ciência e
Tecnologia de Alimentos, de 14 a 16 de outubro de 2015, na UFPR
campus Centro Politécnico, em Curitiba (PR).

Curitiba, 16 de outubro de 2015

Prof. Dr. Ruperisio Alvares Cançado
Presidente do XIII ERSCTA

Profa. Dra. Renata Ermlind Freitas de Macedo
Coordenadora da Comissão Científica do XIII ERSCTA

