

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Antibióticos
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial

REBEKA CRISTIANE SILVA DOS SANTOS

MICROENCAPSULAÇÃO DE *Lactobacillus casei* POR SPRAY DRYING

RECIFE
2013

REBEKA CRISTIANE SILVA DOS SANTOS

MICROENCAPSULAÇÃO DE *Lactobacillus casei* POR SPRAY DRYING

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Christine
Lamenha Luna Finkler

Co-orientador: Prof. Dr. Leandro Finkler

RECIFE

2013

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Santos, Rebeka Cristiane Silva dos
Microencapsulação de *Lactobacillus* casei por Spray Drying/
Rebeka Cristiane Silva dos Santos-Silva– Recife: O Autor, 2013.

120 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Christine Lamenha Luna Finkler

Coorientador: Leandro Finkler

**Dissertações (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biotecnologia
Industrial, 2013.**

Inclui bibliografia

- 1. *Lactobacillus* 2. Probióticos 3. Cápsulas I. Finkler,
Christine Lamenha Luna (orientadora) II. Finkler, Leandro
(coorientador) III. Título**

579.37

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 249

REBEKA CRISTIANE SILVA DOS SANTOS

MICROENCAPSULAÇÃO DE *Lactobacillus casei* POR SPRAY DRYING

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

COMISSÃO EXAMINADORA

Ester Ribeiro Gouveia
UFPE

Patrícia Moreira Azoubel
UFPE

Christine Lamenha Luna Finkler
UFPE

RECIFE, 16 DE ABRIL DE 2013.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Aldo e Marina. minha base,
minhas forças, eterna admiração e infinito amor.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre presente na minha vida, e tornar tudo possível.

Aos meus pais Aldo e Marinalva, que com muito carinho, dedicação e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida, por me incentivarem com muito amor para que meus desejos e planos se realizassem.

Ao meu irmão Aldo Júnior meu eterno '*nininho*', pelo carinho, apoio, incentivo e pelo tantos momentos compartilhados juntos.

Aos meus sobrinhos Victor e Vinícius pelas risadas, por tantas vezes não entenderem e perguntarem o que tanto tia fazia na frente do computador.

A toda equipe técnica do CAV, pelo apoio nas análises. Agradeço especialmente a Silvio, Edilene e Glebson.

A Gabriel por toda a ajuda, quando me via perdida dentro do laboratório, pelos conselhos, por tirar minhas tantas dúvidas, e como eram muitas.

Ao prof. Dr. Luciano Avallone, por disponibilizar o DSC e o DTG, e ao mestrando Tibério pelo apoio e sugestões nas análises térmicas, junto a UFRPE.

A empresa Biologicus®, por ser uma parceira no nosso trabalho, em especial ao Dr. Djalma.

Aos demais colegas de laboratório em especial a Alana, Amaro, Ana, Diego e Gabi, pela amizade e companhia ao longo do desenvolvimento do trabalho.

A todos meus grandes amigos do mestrado, como me esquecer de vocês, amigos que levarei por toda a vida, as minhas '*nêgas*' Edkarlla e Mariana. Aos meus eternos e bons amigos Gustavo e Danilo.

A todo o corpo docente e técnico do PPGBI, em especial ao secretário Klayton que sempre esteve de bom grado me ajudando.

As professoras Dr^a. Márcia Vanusa, a Dr^a. Fátima Vieira, a Dr^a Tânia Stanford e a Dr^a Teresinha Gonçalves por aceitarem participar da banca de qualificação e da banca do projeto e por avaliarem o trabalho contribuindo para melhorá-lo.

À FACEPE pelo suporte financeiro.

Ao meu co-orientador professor Dr. Leandro Finkler pelas trocas de idéias, paciência, e grande colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os grandes e companheiros amigos que fiz nessa jornada, Dani, Elizandra, Janilton, Miguel, e Túlio, passamos por muita coisa juntos, sem vocês não teria chegado até aqui, o meu muito obrigada.

Ao meu eterno amigo Odael, que sempre me aconselhava: Olha o foco Rebeka, olha o foco.

Aos meus amigos que desde a infância estiveram ali, que sempre com paciência me escutavam explicar com que trabalhava, mesmo sem entender uma palavra, já me recepcionavam perguntando: Como estão os seus *Lactobacillus* ?.

Aos meus velhos amigos, que dividi minhas angústias, frustrações e sucessos: Jaqueline, Marcel, Priscila, Rafaella, Rafael e Sabrina.

A todos que de maneira direta ou indireta me auxiliaram neste trabalho, muito obrigada.

E por último, mas não menos importante, agradeço à minha orientadora professora Dr^a Christine Lamenha Luna Finkler pela dedicação, suporte, carinho e oportunidade de crescimento pessoal e profissional. Ela sempre foi minha base, que sempre com sua serenidade e excelência em tudo que faz, sempre me mostrou o melhor caminho a seguir. Sempre compreensiva, entendeu minhas dificuldades, acreditando em mim, mesmo sabendo da minha inexperiência. Fez *jus* ao nome orientadora, se tornando mais que isso, uma pessoa a qual tenho uma imensa admiração e carinho. Levarei para toda a vida, profissional e pessoal, o exemplo de garra e determinação que aprendi nesses dois anos trabalhando com ela. Deixo aqui meus profundos e sinceros agradecimentos a ela.

“Mesmo quando nossas esperanças fogem da realidade, e nós finalmente temos que nos render à verdade, isso só significa que perdemos a batalha de hoje. Não a guerra de amanhã.”

(Grey's Anatomy)

RESUMO

No presente estudo foi desenvolvida uma formulação microencapsulada contendo o micro-organismo probiótico *Lactobacillus casei* utilizando a técnica de secagem por *spray drying*. O ensaio fermentativo foi realizado em duas etapas: escolha da menor concentração de glicose no meio de cultivo e avaliação da cinética de crescimento. O micro-organismo foi cultivado em frascos em condição estacionária empregando-se soro de leite como substrato para crescimento celular, sendo obtidos os dados cinéticos do cultivo pela determinação do teor de células viáveis e pH. O caldo fermentado foi submetido à microencapsulação empregando o método de secagem por *spray drying*. Para a otimização das condições de secagem, foi empregado um planejamento experimental do tipo DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional), com duas variáveis independentes (temperatura de entrada do ar e concentração do agente encapsulante maltodextrina), tendo como variável resposta a concentração de células viáveis. As microcápsulas obtidas foram caracterizadas pela análise de solubilidade, higroscopicidade, molhabilidade, concentração de células viáveis, atividade de água, análise térmica e teor de umidade. A caracterização morfológica foi realizada por microscopia óptica, e a estabilidade dos pós foi avaliada durante um tempo de estocagem de 60 dias. A cinética de crescimento celular demonstrou que a fase de crescimento exponencial se inicia a partir de 17 h de cultivo, com fase estacionária a partir de 36 h e velocidade máxima de crescimento (μ_{Max}) de $0,52 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$. Ao final de 43 h, é atingida uma concentração de células viáveis de $3,0 \times 10^{10}$ UFC/mL. A condição de secagem selecionada foi uma temperatura do ar de entrada de 70°C e 25 % de maltodextrina, conferindo às microcápsulas uma umidade de $4,8 \pm 0,43 \%$, solubilidade de $97,03 \pm 0,04 \%$, molhabilidade de 100% em 1,16 minutos, atividade de água de 0,14, higroscopicidade de 35,20 g H₂O/100g e uma concentração de células viáveis de $1,12 \times 10^{10}$ UFC/g. A temperatura de -8 °C garantiu a manutenção da viabilidade celular, mantendo a concentração das células acima de 9 log UFC/g durante 60 dias. As microcápsulas apresentaram forma esférica e superfície uniforme. Os resultados da análise térmica sugerem que foram obtidas microcápsulas com elevada estabilidade térmica.

Palavras-chave: Atomização. Alimentos funcionais. Planejamento estatístico.

ABSTRACT

In the current research a microencapsulated formulation containing the probiotic micro-organism *Lactobacillus casei* was developed using the *spray drying* technique. Fermentation assays were carried out in two steps: choosing the lowest glucose concentration in the culture medium and evaluation of growth kinetics on the selected culture medium. The micro-organism was grown in flasks in stationary condition employing whey as substrate for cell growth; cell culture kinetic data were obtained by determination of viable cells counting and pH. The fermented broth was subjected to microencapsulation by the *spray drying* method. For the optimization of drying conditions was used a rotational central composite design with two independent variables (air inlet temperature and concentration of the encapsulating agent maltodextrin) and one dependent variable (concentration of viable cells). The microcapsules were characterized by analysis of solubility, hygroscopicity, wettability, viable cell concentration and moisture content. Morphological characterization was performed by optical microscopy, and powders stability was evaluated during a storage time of 60 days. The cell growth kinetics demonstrates that the exponential growth phase begins after 17 h, with the stationary phase starting after 36 h and maximum growth speed (μ_{Max}) of $0.52 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$. After 43 h a viable cell concentration of $3.0 \times 10^{10} \text{ CFU / mL}$ was achieved. The selected drying conditions were inlet air temperature of $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and 25 % maltodextrin, resulting in microcapsules with humidity of $4.8 \pm 0.43 \text{ \%}$, solubility of $97.03 \pm 0.04 \text{ \%}$, wettability of 100% at 1.16 minutes, water activity of 0.14, hygroscopicity of $35.20 \text{ g H}_2\text{O}/100\text{g}$, and a viable cell concentration of $1.12 \times 10^{10} \text{ CFU/g}$. A temperature of $-8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ensured cell viability by maintaining the cell concentration above 9 log CFU/g during 60 days. The microcapsules were spherical and presented uniform surface. The results of thermal analysis suggested that were obtained microcapsules with high thermal stability.

Keywords: Atomization. Functional foods. Statistical planning

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- ESQUEMATIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXCLUSÃO COMPETITIVA	22
FIGURA 2 -MICROCÁPSULA (A); MICROESFERA (B)	35
FIGURA 3-DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO FUNCIONAMENTO DE UM <i>SPRAY DRYER</i> .	38
FIGURA 4-ESTRUTURA MOLECULAR DA UNIDADE DE MALTODEXTRINA.	43
FIGURA 5 - FOTO DO SECADOR MINI <i>SPRAY DRYER</i> (SD-BASIC).	51
FIGURA 6- MEDIDOR DE ATIVIDADE DE ÁGUA PAWKit WATER ACTIVITY METER®.	54
FIGURA 7- MICROSCÓPIO ÓPTICO- NIKON.	56
FIGURA 8- VALORES FINAIS DE PH APÓS 20 HORAS DE FERMENTAÇÃO DE <i>L. CASEI</i> EM MEIO À BASE DE SORO DE LEITE SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE.	59
FIGURA 9-CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS E VARIAÇÃO DO PH DURANTE O CULTIVO DE <i>L. CASEI</i> EM MEIO À BASE DE SORO DE LEITE SUPLEMENTADO COM 20 G/L DE GLICOSE (DADOS RELATIVOS AOS EXPERIMENTOS EM TRIPLICATA).	60
FIGURA 10- <i>L. CASEI</i> - TÉCNICA DE GRAM (AUMENTO DE 1000x).	62
FIGURA 11-SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (A) E CURVA DE CONTORNO (B) PARA A CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE <i>L. CASEI</i> EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DE ENTRADA DO AR E DA CONCENTRAÇÃO DE MALTODEXTRINA PARA O PRIMEIRO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.	65
FIGURA 12-DIAGRAMA DE PARETO PARA A CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE <i>L. CASEI</i> EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DE ENTRADA DO AR E DA CONCENTRAÇÃO DE MALTODEXTRINA PARA O PRIMEIRO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.	66
FIGURA 13- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (A) E CURVA DE CONTORNO (B) PARA A CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE <i>L. CASEI</i> EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DE ENTRADA DO AR E DA CONCENTRAÇÃO DE MALTODEXTRINA PARA O SEGUNDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.	68
FIGURA 14- DIAGRAMA DE PARETO PARA A CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE <i>L. CASEI</i> EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DE ENTRADA DO AR E DA CONCENTRAÇÃO DE MALTODEXTRINA PARA O SEGUNDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	69
FIGURA 15- ASPECTO MACROSCÓPICO DO PRODUTO FORMADO UTILIZANDO UMA CONCENTRAÇÃO DE MALTODEXTRINA DE 8,75 % (M/V) E TEMPERATURA DE 59,3 °C.	70
FIGURA 16- ASPECTO MACROSCÓPICO DO PRODUTO FORMADO UTILIZANDO UMA CONCENTRAÇÃO DE MALTODEXTRINA DE 25 % (M/V) E TEMPERATURA DE 70 °C.	72
FIGURA 17- VALORES DE TGA, DTA E DSC PARA MICROESFERAS DE <i>L. CASEI</i> (A) E MALTODEXTRINA (B) (SECAGEM DE MICROESFERAS DE <i>L. CASEI</i> POR <i>SPRAY DRYING</i> A 70 °C E CONCENTRAÇÃO DE MALTODEXTRINA DE 25 % (M/V).	76
FIGURA 18- AVALIAÇÃO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MICROCÁPSULAS DE <i>L. CASEI</i> POR UM PERÍODO DE 60 DIAS.	80
FIGURA 19- MICROSCOPIA ÓPTICA DAS MICROCÁPSULAS ENCAPSULADAS.	82

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1-MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS REGULAMENTADOS PELA ANVISA.	27
TABELA 2- COMPOSIÇÃO APROXIMADA DO SORO DE LEITE	32
TABELA 3- COMPOSIÇÃO DO MEIO CALDO MRS.	48
TABELA 4-COMPOSIÇÃO DOS MEIOS À BASE DO SORO DE LEITE EMPREGADOS NOS EXPERIMENTOS DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE.	49
TABELA 5 - PRIMEIRO PLANEJAMENTO DO TIPO DCCR EMPREGADO NOS ENSAIOS DE SECAGEM POR SPRAY DRYING (2 VARIÁVEIS, PONTOS AXIAIS COM $A = \pm 1,41$, TRIPLICATA NO PONTO CENTRAL).	52
TABELA 6 -SEGUNDO PLANEJAMENTO DCCR EMPREGADO NOS ENSAIOS DE SECAGEM POR SPRAY DRYING (2 VARIÁVEIS, PONTOS AXIAIS COM $A = \pm 1,41$, TRIPLICATA NO PONTO CENTRAL).	53
TABELA 7- RESULTADOS DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO SORO DE LEITE.	57
TABELA 8- CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE <i>L. CASEI</i> APÓS 20 HORAS DE FERMENTAÇÃO EM MEIO À BASE DE SORO DE LEITE SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE.	58
TABELA 9- RESULTADOS DE ATIVIDADE DE ÁGUA (A_w) DOS PÓS DE <i>L. CASEI</i> OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS DO PRIMEIRO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.	67
QUADRO 1- PRODUTOS ALIMENTÍCIOS PROBIÓTICOS COMERCIALIZADOS NO BRASIL.	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%- Percentual

°D – Grau Dornic

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Aw- Atividade de água

BLs- Bactérias Ácido lácticas

DCCR- Delineamento Composto Central Rotacional

DSC- Calorimetria Exploratória Diferencial

DTA- Análise Térmica Diferencial

FAO- Food and Agriculture Organization

IAL- Instituto Adolfo Lutz

m/m- massa do soluto pela massa da solução

m/v – massa de soluto pelo volume de solução

mL- mililitro

MRS- De Man, Rogosa and Sharpe

MSR- metodologia de superfície de resposta

pH - potencial hidrogeniônico

ppm- Partes por Milhão

RDC- Resolução da Diretoria Colegiada

SST - Sólidos Solúveis Totais

Tg- Transição Vítrea

TGA -Termogravimetria

UFC- Unidade Formadora de Colônia

µm- Micrômetro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS.....	18
2.1.	OBJETIVO GERAL:	18
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	18
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1.	ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	19
3.1.1.	Considerações gerais	19
3.1.2.	Probióticos – conceitos, mecanismos e legislação	21
3.2.	Bactérias ácido láticas e o gênero <i>lactobacillus</i>	28
3.3.	SORO DE LEITE.....	30
3.4.	FATORES IMPORTANTES EM UM PROCESSO FERMENTATIVO	33
3.5.	MICROENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS	34
3.6.	SPRAY DRYING	37
3.6.1.	Fatores que influenciam a secagem por <i>spray drying</i>	40
3.6.2.	Maltodextrina como agente encapsulante	42
3.7.	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS.....	44
4.	METODOLOGIA	47
4.1.	SORO DE LEITE.....	47
4.1.1.	Caracterização do soro de leite.....	47
4.2.	MANUTENÇÃO DO MICRO-ORGANISMO	47
4.3.	PROCEDIMENTOS DE FERMENTAÇÃO	47
4.3.1.	Pré-inóculo e inóculo	47
4.3.2.	Composição do meio de cultura- Concentração de glicose no meio à base de soro de leite	48
4.4.	AVALIAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO	49
4.4.1.	Cinética de crescimento de <i>L. casei</i> em meio à base de soro de leite	49
4.4.2.	Determinação da concentração de células viáveis	49
4.4.3.	Determinação do pH.....	50
4.4.4.	Pesquisa de contaminantes	50
4.4.5.	Teor de sólidos solúveis (SST).....	50
4.5.	MICROENCAPSULAÇÃO POR <i>SPRAY DRYING</i>	50

4.6.	CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS	53
4.6.1.	Contagem de células viáveis dos pós obtidos por <i>spray drying</i>	53
4.6.2.	Solubilidade.....	53
4.6.3.	Atividade de água.....	54
4.6.4.	Molhabilidade.....	54
4.6.5.	Higroscopicidade.....	54
4.6.6.	Teor de umidade.....	55
4.6.7.	Estabilidade das células de <i>L. casei</i> encapsuladas durante estocagem – Vida de prateleira (<i>Shelf life</i>)	55
4.6.8.	Análise térmica.....	55
4.6.9.	Análise da microestrutura.....	56
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SORO DE LEITE E DEFINIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NO MEIO DE CULTURA.....	57
5.2.	CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR	59
5.3.	OTIMIZAÇÃO DA SECAGEM DE <i>L. CASEI</i> POR SPRAY DRYING	62
5.4.	CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS	73
5.4.1.	Análise térmica das microcápsulas.....	75
5.4.2.	Vida de prateleira- (<i>Shelf Life</i>).....	79
5.4.3.	Análise microscópica	82
6.	CONCLUSÕES.....	84
7.	REFERÊNCIAS.	85

1. INTRODUÇÃO

A necessidade de incorporação de uma alimentação saudável e equilibrada aos hábitos diários e o interesse pelos produtos denominados funcionais é cada vez mais crescente. Os alimentos funcionais são aqueles que, além de nutrir, promovem benefícios à saúde do indivíduo (SANDERS, 1998). De acordo com a ANVISA (BRASIL, 2008), enquadram-se como alimentos funcionais os probióticos, licopenos, ácidos graxos, ômega 3, luteína, fibras alimentares, zeaxantina, beta glucana, dextrina resistente, frutooligosacarídeo, goma guar parcialmente hidrolisada, inulina, lactulose, polidextrose, psillium, quitosana, fitoesteróis, manitol, xilitol, sorbitol e proteína de soja.

Os probióticos são classificados como suplementos de micro-organismos vivos, agrupados ou não, que são incorporados à dieta, influenciando de forma benéfica o desenvolvimento e manutenção da microbiota intestinal quando administrados em quantidades adequadas (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002; BRASIL, 2008; REIG; ANESTO, 2002).

Os benefícios da estimulação e manutenção da microbiota autóctone pelos probióticos justificam-se pelo conjunto de ações antagônicas, competitivas e estimuladoras, que resultam em resistência frente à patógenos. A manutenção do epitélio e da microbiota intestinal representa uma barreira estável em indivíduos saudáveis. Esta, quando alterada, facilita a invasão por patógenos e substâncias nocivas. Inúmeras são as vantagens apresentadas na utilização de probióticos: regulação da microbiota intestinal após o uso de antibióticos, diminuição de patógenos através da produção de ácidos e promoção da digestão de lactose (GOMES; MALCATA, 1999).

Os pré-requisitos necessários para o uso comercial dos micro-organismos probióticos são a sua sobrevivência, em número suficientemente elevado, durante a produção e estocagem e à passagem pelo trato gastrointestinal superior (ANNAN et al., 2008; KAILASAPATHY; CHIN, 2000; MARTONI et al., 2008). Torna-se importante também ter sua eficácia comprovada por estudos científicos e não apresentarem histórico de patogenicidade nem de genes que determinem resistência a antibióticos (HOLZAPFEL, SCHILLINGER, 2002; BOUKSAIM et al., 2011; MAKRAS; DE VUYST, 2006).

No Brasil, a ANVISA (BRASIL, 2008) estabelece que a quantidade mínima de micro-organismos probióticos viáveis, deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação de uso diário do produto pronto para o consumo. Estudos indicam que o consumo diário terapêutico de probióticos corresponde a 100 g de produto contendo 6 a 7 log UFC/g (KOMATSU, BURITI; SAAD, 2008).

Nos países desenvolvidos é crescente a popularidade dos alimentos contendo probióticos, e isto se deve aos avanços em pesquisas e desenvolvimento de novos produtos que incorporaram de forma eficiente estes micro-organismos (MATTILA-SANDHOLM, 2002). A sobrevivência destes micro-organismos no trato gastrointestinal humano é questionável, portanto a obtenção de probióticos que resistam à passagem por essa barreira é de grande interesse do ponto de vista nutricional e tecnológico (KAILASAPATHY, 2009). Segundo Ross et al. (2005), condições extremamente ácidas como as encontradas no estômago podem diminuir significativamente o número de células probióticas viáveis que chegariam ao intestino. A aplicação dos probióticos esbarra na dificuldade de elaboração de produtos que tenham boa resistência ao processamento e viabilidade durante a vida útil do produto, já que algumas cepas são extremamente sensíveis.

Para tentar solucionar este problema, métodos como a microencapsulação mostram-se como soluções promissoras, podendo ser utilizados a fim de aumentar a resistência dos micro-organismos a condições extremas (SHAH; RAVULA, 2000). A microencapsulação é definida, sob o ponto de vista microbiológico, como um processo no qual as células microbianas são retidas em uma matriz polimérica, formando microesferas (YOW; ROUTH, 2006). As células imobilizadas são mais resistentes às condições adversas, uma vez que a matriz de imobilização resulta em maior proteção aos micro-organismos (CARVALHO et al., 2006; LEE et al., 1983).

Portanto, a microencapsulação é uma alternativa válida para a obtenção de microcápsulas de baixo custo nas indústrias de alimentos. Dentre os diversos métodos de microencapsulação, o encapsulamento por *spray drying* é uma das metodologias mais empregadas, devido à grande disponibilidade de equipamentos, baixo custo do processo e possibilidade de emprego de uma ampla variedade de agentes encapsulantes com estabilidade do produto final (REINEICCIUS, 1989).

Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os suplementos probióticos mais empregados, sendo estudados há mais de 70 anos

(GUARNER; MALAGELADA, 2006; SHORTT et al.,1999). Dentro do gênero *Lactobacillus* destaca-se *L. casei*. A obtenção de células deste micro-organismo é em geral realizada por cultivo submerso, e o emprego de substratos de baixo custo, tais como o soro de leite, viabiliza sua produção em escalonamento. O conhecimento da fisiologia, metabolismo, utilização de diferentes nutrientes, temperatura e pH de crescimento permite obter um melhor controle do processo (YOKOYA et al., 1997).

Neste contexto, a presente pesquisa teve como objetivo empregar um meio de cultura formulado à base de soro de leite para o cultivo de *L. casei* e otimizar a secagem deste micro-organismo pela técnica de *spray drying*, investigando a sua sobrevivência sob diferentes condições de armazenamento.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

Cultivar células de *Lactobacillus casei* empregando meio de cultura à base de soro de leite e investigar o processo de microencapsulação por *spray drying*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar o soro de leite quanto à sua composição físico-química;
- Determinar a concentração da suplementação de glicose ao meio à base de soro de leite para produção de células de *L. casei*;
- Cultivar *L. casei* por fermentação utilizando como substrato soro de leite e realizar o acompanhamento cinético do cultivo (células viáveis e pH);
- Desenvolver uma formulação sólida microencapsulada pelo método do *spray drying* visando avaliar as condições de secagem sobre a viabilidade das células pela técnica do planejamento experimental;
- Caracterizar as microcápsulas quanto a sua qualidade final após processo de secagem;
- Avaliar a estabilidade dos pós durante um tempo de estocagem de 60 dias (vida de prateleira- *shelf life*) sob diferentes condições de temperatura.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ALIMENTOS FUNCIONAIS

3.1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

As modificações no estilo de vida da sociedade têm afetado a qualidade da vida do homem atual, despertando a consciência sobre a importância do ato de se alimentar visando à prevenção ao invés da cura de doenças.

Assim, mesmo considerando o princípio básico dos alimentos, que é o fornecimento de nutrientes para as exigências metabólicas, conhecimentos recentes suportam a teoria de que, além das necessidades nutricionais, a dieta alimentar pode modular atividades biológicas (MENRAD, 2003).

Este fato tem sido ressaltado pela comunidade científica em casos em que é observada uma baixa incidência de doenças em alguns povos. Por exemplo, os esquimós, assim como os franceses, possuem características peculiares na sua alimentação: nos primeiros, a alimentação é baseada em peixes e produtos ricos em ácidos graxos, enquanto que os últimos são grandes consumidores de vinho tinto. Para ambos os casos, tem se observado que o índice de problemas cardíacos é baixo (ANJO, 2004).

As evidências científicas da relação dieta/saúde vêm impulsionando um mercado de alimentos diferenciados (ZENITH INTERNATIONAL, 2007). Nos últimos 20 anos tem-se visto cada vez mais trabalhos sobre essa relação, e a possibilidade de prevenção de doenças despertou o interesse não só da comunidade científica, mas também das indústrias de alimentos, que viram uma boa oportunidade de negócio (PALANCA et al., 2006). Estas têm introduzido cada vez mais alimentos de qualidade, sustentados pela necessidade do mercado, conscientização dos consumidores, dos órgãos reguladores e do potencial econômico dos produtos (BALDISSERA et al., 2011).

Nesse contexto temos os alimentos funcionais, que de forma geral são todos os alimentos ou bebidas, apresentados em forma de alimento comum, e consumidos como parte da dieta, que produzam benefícios à saúde, graças à presença de

ingredientes que propiciem a manutenção do bem-estar físico e mental (MORAES; COLLA, 2006; CÂNDIDO; CAMPOS, 2005).

A concepção de alimentos funcionais foi inicialmente divulgada pelo Japão ainda na década de 80, através de um programa de governo que tinha como objetivo desenvolver alimentos saudáveis para uma população que envelhecia e apresentava uma grande expectativa de vida (ANJO, 2004). Os alimentos de apelo funcional demonstram a capacidade de regulação e auxílio contra doenças como hipertensão, diabetes, câncer, osteoporose e coronariopatias (SOUZA et al., 2003).

Todavia, mesmo diante do progressivo aumento da popularidade dos alimentos funcionais, não existe uma definição universal. A agência americana FDA (Food and Drug Administration) não possui uma definição legal para o termo, enquanto que a ADA (American Dietetic Association), o IFIC (International Food Information Council) e o IFT (Institute of Food Technologists) não têm um consenso sobre a definição do termo 'alimento funcional' (BALDISSERA et al., 2011). A US General Accounting Office - GAO definiu alimentos funcionais como alimentos que alegam ter benefícios além da nutrição básica (MORAES; COLLA, 2006).

No Brasil, desde o início da década de 90 já haviam pedidos de registro de produtos que alegavam ter efeitos além dos nutricionais. Somente a partir do ano de 1998, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamentou técnicas para análise de novos alimentos e ingredientes, incluindo os chamados "alimentos funcionais". Porém, apenas no ano de 2002 os alimentos funcionais foram regulamentados pela Resolução RDC nº 02 de 07 de janeiro de 2002, que aprovou o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedade funcional ou de saúde. Segundo a referida resolução, os produtos considerados funcionais são classificados e divididos em:

- ✓ Carotenóides;
- ✓ Fitoesteróis;
- ✓ Flavonóides;
- ✓ Fosfolipídeos;
- ✓ Organosulfurados;
- ✓ Polifenóis;
- ✓ Probióticos.

Estes produtos podem ser apresentados nas formas sólida, semi-sólida ou líquida, tais como: tabletes, comprimidos, drágeas, pós, cápsulas, granulados, pastilhas, soluções e suspensões (BRASIL, 2002).

A literatura faz referência a alguns critérios e alegações a um alimento funcional, tais como: fazer parte da alimentação usual; efeitos positivos devem ser obtidos em quantidades que não acarretem toxicidade, devem exercer ação metabólica ou fisiológica que contribuam para a saúde física, que perdurem mesmo após suspensão de sua ingestão e, por fim, os alimentos funcionais não devem ser considerados como cura nem tratamento de doenças (BORGES, 2000). Trabalhos recentes têm relatado o desenvolvimento de alimentos funcionais na área de prebióticos e probióticos (ROBERFROID, 2007).

3.1.2. PROBIÓTICOS – CONCEITOS, MECANISMOS E LEGISLAÇÃO

O conhecimento da microbiota intestinal e suas interações levaram ao desenvolvimento de estratégias de estimulação e manutenção da microbiota autóctone, microbiota esta formada por espécies que em sua maioria são anaeróbicas, responsáveis pela manutenção do bem-estar e ausência de patologias.

O epitélio intestinal intacto e a microbiota autóctone do intestino representam uma barreira estável em indivíduos saudáveis. Esta, quando alterada, facilita a invasão por patógenos, antígenos estranhos e substâncias nocivas (GOMES; MALCATA, 1999). Dada a essa condição, o intestino é capaz de responder a alterações físicas, químicas e anatômicas. A manutenção do microssistema cinético do trato gastrointestinal mantém o equilíbrio das funções fisiológicas do hospedeiro, e esse equilíbrio pode ser mantido por uma suplementação com probióticos (BIELECKA et al., 2002). Portanto, a reposição da microbiota é um dos objetivos do seu consumo (ITSARANUWAT; SHAL-HADDAD; ROBINSON, 2003).

O termo probiótico é de origem grega e significa '*para a vida*', sendo inicialmente proposto por Lilly e Stillwl (1965). Desde então, diversas definições foram propostas. Fuller (1989) classificou os probióticos como suplementos alimentares baseados em micro-organismos vivos que influenciavam positivamente o hospedeiro, promovendo benefícios. Havenaar et al. (1992) optaram por classificar

os probióticos como culturas puras ou mistas de micro-organismos vivos que quando aplicadas aos animais ou ao homem, proporcionam benefícios, promovendo o balanço de sua microbiota intestinal. Atualmente, a definição mais aceita refere-se ao conceito contemporâneo de que probióticos são organismos vivos (bactérias ou leveduras) que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas, cuja ingestão leva a importantes mudanças fisiológicas ao organismo, através do equilíbrio da microbiota intestinal (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS & WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; BRASIL, 2008; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2004; ANAL; SINGH, 2007).

Fuller (1989) descreveu que os efeitos biológicos associados aos probióticos eram oriundos da produção de substâncias e mecanismos antagonistas ao crescimento de patógenos e estimulação da imunidade. Porém, o mecanismo completo de ação dos probióticos não é completamente elucidado.

Uma das teorias mais aceitas é a da 'exclusão competitiva' (Figura 1). Nesta teoria, o probiótico competiria fisicamente com os possíveis patógenos pelos nutrientes do nicho ecológico e/ou pelos sítios de adesão, impedindo assim a sua proliferação e formando uma barreira física na mucosa; barreira esta que justifica sua atividade moduladora de reações alérgicas alimentares (SAAD, 2006; HAVENAAR et al., 1992). A 'exclusão competitiva' justifica a necessidade de administração continuada dos probióticos a fim de conferir seus benefícios (GUARNER; MALAGELADA, 2003; KAUR et al., 2002).

Os benefícios na utilização de probióticos justificam-se pelo espectro de ações antagônicas, competitivas e estimuladoras, que resultam em resistência frente à patógenos. Segundo Naidu e Clemens (2000), o conjunto de atividades dos probióticos pode ser dividido em efeitos antimicrobianos, nutricionais e fisiológicos. A utilização de culturas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas em detrimento de bactérias potencialmente patológicas, reforçando os mecanismos naturais de proteção (SAAD; CRUZ; FARIA, 2011).

Figura 1- Esquematização do processo de exclusão competitiva



Fonte: A autora

Os probióticos ainda estão envolvidos na produção de substâncias antimicrobianas como as bacteriocinas, produção de ácidos orgânicos voláteis, alterações no metabolismo microbiano, produção de peróxido de hidrogênio, estimulação de imunidade do hospedeiro, aumento do nível de anticorpos, produção de citocinas e alívio do intestino irritado (SCHREZENMEIR; DE VRESE, 2001; KOPP-HOOLIHAN, 2001; CALDER; KEW, 2002; VAN DE WATER, 2003; SAAD, 2006; NAIDU et al., 1999; PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002; RODRIGUEZ, 1996; VILLANI et al., 1995; AUDISIO et al., 2000; JIN et al., 2000; OGAWA et al., 2001; HAVENAAR et al., 1992). Roberfroid (2002) atribuiu ao uso de alimentos probióticos a melhora da absorção de nutrientes como o cálcio.

Muitas outras vantagens podem ser citadas pela utilização de probióticos. Dentre estas, cabe destacar: regulação da microbiota intestinal após o uso de antibióticos, diminuição de patógenos através da produção de ácido acético e ácido lático e promoção da digestão de lactose através da produção da enzima beta-D-galactosidase (GOMES; MALCATA, 1999). Outros efeitos benéficos são atribuídos ao uso frequente de probióticos, porém sem elucidação científica: diminuição do risco de câncer de cólon através da neutralização de efeitos genotóxicos e mutagênicos, diminuição do risco de doença vascular, diminuição no nível de colesterol plasmático, efeitos anti-hipertensivos e combate a patologias causadas por micro-organismos, como *Helicobacter pylori* (GOTTELAND; CRUCHET, 2003) e *Clostridium difficile*, além da diminuição de ocorrência de infecções urogenitais (SCHREZENMEIR; DE VRESE, 2001; FERREIRA, 2009).

Cepas probióticas têm sido estudadas e exploradas comercialmente em diversos produtos (SOCCOL et al., 2010), sendo crescente o interesse na adição de

micro-organismos probióticos em vários alimentos na busca pelo aumento do valor nutricional e terapêutico (O'SULLIVAN, 2001). Os alimentos probióticos são encontrados em várias apresentações: na forma de pó ou cápsulas para serem diluídas, formulações para animais, produtos farmacêuticos, alimentos de origem vegetal, produtos de confeitaria e produtos lácteos fermentados ou não (FERREIRA, 2003; DAVIDSON et al., 2000; GARDINER et al., 1999; INGHAM, 1999; OLIVEIRA et al., 2002; STANTON et al., 1998; STANTON et al., 2003).

Os micro-organismos probióticos mais utilizados são os dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*; contudo, leveduras como *Saccharomyces boulardii* também tem sido utilizadas com potencial probiótico (KELESIDIS, 2012). Citam-se no Quadro 1 alguns produtos comercializados no Brasil contendo bactérias probióticas.

No mundo, as regras para enquadramento dos probióticos divergem muito. O primeiro país a regularizar os alimentos funcionais foi o Japão, isso no ano de 1980. A contagem mínima exigida desses micro-organismos em produtos lácteos nesse país é de 10^7 UFC/mL (SHORTT, 1999). Ainda segundo (KOMATSU, BURITI; SAAD, 2008), podem ser considerados alimentos probióticos aqueles que contenham pelo menos 10^6 UFC a 10^7 UFC g⁻¹ no produto para consumo, disponíveis em todo o prazo de sua vida útil. Considerando-se produtos lácteos, tem-se como parâmetro de indicação de uso a quantidade de 10^7 UFC/g de bactérias probióticas viáveis contidas em 100 g do produto (VINDEROLA; RENHEIMER, 2000; CHAVARRI et al., 2010; CRUZ et al., 2009; GOMES; MALCATA, 1999).

No Brasil, uma resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o REGULAMENTO TÉCNICO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS E PROBIÓTICOS ISOLADOS COM ALEGAÇÃO DE PROPRIEDADE FUNCIONAL/ E OU SAÚDE, diz que 'A quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de

Quadro 1- Produtos alimentícios probióticos comercializados no Brasil.

PRODUTO/MARCA REGISTRADA	PROBIÓTICOS (MICRO-ORGANISMOS)	MERCADO/GÊNERO	APRESENTAÇÃO
TopFlora®	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>B. lactis</i>	Alimentício	Pó (sachês)
BEM VITAL REGULATIS®	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. lactis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. lactis</i>	Alimentício	Pó (sachês)
iFlora Nasal Healt®	<i>B. bifidum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	Farmacêutica	Cápsulas
SimFort®	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. lactis</i>	Farmacêutica	Pó (sachês)
Biocamp®	Não informado	Alimentação animal	Pó Líquida
Lactofofos®	<i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>B. lactis</i>	Alimentício	Pó (sachês)
Biocamp®	Não informado	Alimentação animal	Pó Líquida
PBIOTICS®	<i>B. bifidum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>L. acidophilus</i>	Alimentação animal	Ampolas

Fonte: Adaptado de Oliveira (2007).

Quadro 1- (continuação) - Produtos alimentícios probióticos comercializados no Brasil.

PRODUTO/MARCA REGISTRADA	PROBIÓTICOS (MICRO-ORGANISMOS)	MERCADO/GÊNERO	APRESENTAÇÃO
Biologicus[®]	Não informado	Alimentício Cosméticos	Bebidas fermentadas, Queijos, Cápsulas, Iorgutes
Yakult / Yakult[®]	<i>L. casei Shirota</i>	Alimentício	Bebida fermentada, Sobremesa
Chamyto /Nestlé[®]	<i>L. jonhsonii</i> <i>L. helveticus</i>	Alimentício	Bebida fermentada
Vigor Club- Pke-mons[®]	<i>L. casei</i> <i>L. acidophilus</i>	Alimentício	Bebida fermentada
Batativo[®]	<i>L. casei</i>	Alimentício	Iorgute
LC1 Active Nestlé[®]	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> <i>L. acidophilus</i> NCC 208	<i>L.</i> Alimentício	Iorgute
Iogurte Biofibras[®]	<i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>L. acidophilus</i>	<i>L.</i> Alimentício	Iorgute

Fonte: Adaptado de Oliveira (2007)

Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante' (BRASIL, 2008). A resolução lista ainda os micro-organismos que segundo a legislação possuem um apelo probiótico comprovado (Tabela 1).

Tabela 1-Micro-organismos probióticos regulamentados pela ANVISA.

Probióticos
<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus casei Shirota</i>
<i>Lactobacillus casei variedade rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus casei variedade defensiv</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>Bifidobacterium animalis</i> (incluindo a subespécie <i>B. lactis</i>)
<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>

Fonte: (BRASIL, 2008).

Os principais critérios de seleção de um micro-organismo como probiótico para aplicação industrial são (MATTILA-SADHOLM et al., 2002; HOLZAPFEL, SCHILLINGER, 2002; BOUKSAIM et al., 2011; MAKRAS; DE VUYST, 2006; KIM, 1988; COLLINS et al., 2001; LEE et al., 1999; SAARELA et al., 2000; STANTON et al., 2003; KUMAR; GHOSH; GANGULI, 2011):

- Capacidade de propiciar efeitos benéficos ao hospedeiro;
- Exercer atividade antagonista contra micro-organismos patogênicos;
- Deve possuir boas propriedades tecnológicas de modo que possa ser produzido e incorporado em produtos alimentares sem perder a viabilidade e funcionalidade ou criar sabores e texturas desagradáveis, resistindo além de tudo durante sua estocagem e transporte;
- Os micro-organismos necessitam sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal superior, chegarem vivos e bioativos em seu local de ação, aderirem e colonizarem o trato; tolerando o baixo pH do suco gástrico, resistindo à ação da bile e das secreções pancreáticas, mantendo-se ativos no intestino;

- Possuir a capacidade de adesão à superfície da mucosa intestinal;
- Apresentar distribuição uniforme na formulação dos alimentos;
- Sua eficácia deve ser comprovada por estudos científicos;
- Ser de origem humana;
- Não devem apresentar histórico de patogenicidade, nem associação a doenças, e principalmente não apresentar genes determinantes de resistência a antibióticos.

Sob o ponto de vista biotecnológico, os alimentos formulados com objetivo funcional devem apresentar características benéficas e propriedades sensoriais adequadas, onde sua incorporação aos alimentos garanta a sua viabilidade e funcionalidade, resistindo ao armazenamento e às condições de processamento do produto. A resistência aos níveis de acidez, bile e enzimas do trato gastrointestinal é fundamental para garantir a atividade biológica dos micro-organismos probióticos (ALAMPRESE et al., 2002; MATTILA-SADHOLM et al. 2002).

A escolha de um sistema carreador adequado é fator fundamental no desenvolvimento de alimentos funcionais probióticos, pois a sobrevivência desses micro-organismos é afetada pelas características físico-químicas e fatores intrínsecos dos alimentos transportadores (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010). Além disso, em relação às perspectivas de processamento de alimentos, é desejável que as cepas sejam apropriadas para a produção industrial em larga escala e resistam às condições de processamento, como a secagem por atomização (STANTON et al., 2003). Na produção de um alimento probiótico, o produto final deve ter vida média variando de 15 a 30 dias. É necessário ainda que os micro-organismos permaneçam viáveis e em número elevado ($>10^6$ UFC/mL) durante a vida de prateleira (BRASIL, 2001; TRABULSI; SAMPAIO, 2000).

3.2. BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS E O GÊNERO *LACTOBACILLUS*

O conceito de “bactérias lácticas” foi introduzido no início do século XX, em referência as bactérias que fermentavam e coagulavam o leite. Já em 1919, uma definição mais completa foi apresentada, definindo-as como “um grande grupo natural de bactérias em bastonetes e cocos, imóveis, sem esporos, que fermentam açúcar, gerando como produto, principalmente, o ácido lático”.

As bactérias ácido lácticas são Gram-positivas e não-esporogênicas e que acumulam o ácido lático como produto primário do metabolismo (FERREIRA, 2003).

Devido a sua relativa simplicidade são utilizadas nos mais diversos segmentos tecnológicos (KONINGS et al., 2000). Podem ser enquadradas em três grupos distintos quanto ao modo de degradação dos carboidratos, sendo os grupos discriminados quanto aos produtos finais da fermentação (KANDLER, 1983). Bactérias ácido lácticas homofermentativas têm o ácido láctico como seu principal metabólito, enquanto que bactérias heterofermentativas produzem, além de ácido láctico, outros compostos como ácido acético, etanol e gás carbônico. Os grupos apresentados abaixo se assemelham quanto ao fato de degradarem apenas hexoses (KANDLER, 1983; KANDLER; WEISS, 1986).

- ✓ Homofermentativos obrigatórios;
- ✓ Heterofermentativos obrigatórios;
- ✓ Heterofermentativos facultativos.

As bactérias ácido lácticas (BLs) são muito utilizadas para alterar propriedades aromáticas e texturais de gêneros alimentícios e para prolongar a vida de prateleira, sendo cruciais na fabricação de produtos fermentados (BERTOLDI, 2003). Foram os primeiros micro-organismos utilizados na produção de alimentos industrializados, sendo atualmente os mais bem caracterizados no que concerne à sua genética, fisiologia e aplicações (KONINGS et al., 2000).

As BLs compreendem os gêneros: *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactobacillus* (JAY, 1996). O gênero *Lactobacillus* compreende cepas que são tradicionalmente incorporadas em alimentos para consumo humano (LERAYER et al., 2009), e que são de grande importância na indústria alimentícia. Os micro-organismos deste gênero são formados por células em forma de bastonetes que medem de 0,5-1,2 x 1,0-10 µm (BERGEY; HOLT, 1994) e são amplamente distribuídos na natureza. São imóveis em sua grande maioria, catalase e oxidase negativas, não reduzem nitrato, não produzem indol ou H₂S e não têm a capacidade de formar esporos (KONEMAN et al., 2005). É o maior gênero das BLs, compreendendo cerca de 80 espécies (AXELSSON, 2004).

Requer para o seu crescimento aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, vitaminas e carboidratos fermentescíveis. A temperatura ótima de crescimento situa-se na faixa de 27 a 40 °C e são organismos acidúricos (BERGEY; HOLT, 1994; PAROLO, 2009).

O grupo *Lactobacillus casei* engloba as espécies *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*. Essas espécies são utilizadas largamente pelas indústrias alimentícias na produção de leites fermentados e como culturas iniciadoras de processos fermentativos. O sistema enzimático (*enzima peptidase*) desenvolvido pelas bactérias deste grupo influencia diretamente no *flavour* do alimento (MARTINEZ-CUESTA et al., 2001).

As espécies *L. casei* e *L. paracasei* são as maiores representantes quando se trata da colonização da microbiota intestinal humana (VÁSQUEZ et al., 2005). *L. casei* pertence ao grupo heterofermentativo quanto ao seu metabolismo de açúcares. É uma bactéria não patogênica e que vem sendo estudada em alimentos probióticos há mais de 70 anos (SHORTT et al., 1999). Apresentam-se em forma de bastonetes, medindo 0,7 a 1,1 mm de largura e 2,0 a 4,0 µm de comprimento, com tendência a formar cadeias e não crescem em temperaturas acima de 45 °C. Têm a capacidade de fermentar, dependendo da cepa, açúcares como a glicose, sacarose, lactose, maltose, manitol e ribose (KANDLER; WEISS, 1986).

L. casei tem aplicações como probiótico, na produção de ácido lático e na indústria farmacêutica. Há um amplo estudo quanto as suas propriedades promotoras de saúde, sendo umas das espécies de maior aplicação probiótica em alimentos industrializados. Possuem a capacidade de colonizar diversos locais naturais ou não (VÁSQUEZ et al., 2005; STILES; HOLZAPFEL, 1997). Esta espécie é particularmente resistente a grandes variações de pH (BRINK; TODOROV, 2006).

3.3. SORO DE LEITE

O leite é um fluido biológico complexo, que contém lipídeos, proteínas, carboidratos, minerais, vitaminas, enzimas, aminoácidos essenciais, glicomacropéptídeos, imunoglobulinas e minerais. O Brasil é o sétimo produtor mundial de leite, representando assim 4,4% da produção mundial (FAO, 2005).

O resíduo líquido obtido a partir da coagulação do leite é o que chamamos de soro de leite (BRASIL, 2005), sendo o maior subproduto da indústria leiteira. O soro de leite é um importante co-produto gerado pelos laticínios após a coagulação da caseína (MARSHALL, 2004; SMITHERS, 2008). No processo de coagulação para a produção de queijo, cerca de nove litros de soro de leite são obtidos para cada quilograma de queijo produzido (JELEN, 2003). Durante esse processo, há a

transferência de componentes do leite para o soro, o que chamamos de cifra de transição, que é responsável pela sua composição físico-química (VILELA, 2009).

De acordo com o tipo de coagulação sofrida pela caseína, o soro de leite possui duas tipologias: o soro doce, obtido pela coagulação enzimática da caseína, e o soro ácido, obtido pela coagulação por bactérias lácticas ou através da coagulação ácida (MUCCHETTI; NEVIANI, 2006; TEIXEIRA, 2002). Os principais componentes do soro são descritos na Tabela 2.

Devido a sua versatilidade e seu alto valor nutricional, empresas buscam inovação utilizando-se do soro de leite como matéria prima (MARSHALL, 2004; GLOBALFOOD, 2006; MARRETT, 2009; WALSTRA, 2001). Além de apresentar-se como um rico efluente, sob o ponto de vista nutricional, o soro de leite destaca-se ainda devido a sua atividade antioxidante, anti-hipertensivo, antitumoral, antiviral, antibacteriano e agente quelante (MARSHALL, 2004; YALCIN, 2006; KRISSANSEN, 2007). As proteínas provenientes do soro têm grande variedade de função, o que permite a adequação da sua utilização em alimentos.

Porém, na maioria das indústrias de processamento de leite, o soro não é reaproveitado, sendo descartado de forma inadequada. No Brasil, o percentual de soro descartado sem nenhum tipo de tratamento chega a 50% (SANTANA et al., 2005). Mesmo com a comprovação das potencialidades do soro como matéria-prima, muitas indústrias o consideram como resíduo e o descartam (BALDISSERA et al., 2011).

Tabela 2- Composição aproximada do soro de leite

Composição aproximada do soro de leite ácido e doce, %		
Constituinte	Soro Doce	Soro Ácido
Sólidos totais	6,5	6,4
Umidade	93,5	93,6
Lipídeos	0,04	0,05
Lactose	4,9	4,8
Cinzas	0,8	0,5
Cálcio	0,12	0,043
Fósforo	0,065	0,040
Potássio	0,16	0,16
Cloreto	0,11	0,11
Ácido láctico	0.4	0.05

Fonte: Adaptado de Ozimek, 2005. Disponível em:
<<http://www.ales2.ualberta.ca/afns/courses/nufs403/index.asp>>

O soro sob o ponto de vista biológico é um dos resíduos mais poluentes, com uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO) de 30.000 a 60.000 ppm. A sua DBO chega a ser 175 vezes maior do que os típicos efluentes de esgoto (BALDISSERA et al., 2011). O descarte deste subproduto causa grande impacto ambiental, e o seu tratamento para descarte gera ônus às indústrias, correspondendo também a um grande desperdício, dada as suas características nutricionais.

O tratamento de efluentes ricos em matéria orgânica, como é o caso do soro de leite, é obtido através de processos aeróbicos, anaeróbicos ou de arranjos destes, o que apesar de solucionar o problema associado ao seu descarte, não gera valor agregado ao produto no final do processo. Sendo assim, o tratamento do soro através destes processos é considerado muitas vezes apenas uma operação de custo, refletindo diretamente no valor final do produto para o consumidor (TRINDADE, 2002). Outra característica é que o soro de leite apresenta uma alta percentagem de água, o que inviabiliza sua desidratação em escala industrial, além de ser perecível (ALMEIDA et al., 2001; MACHADO et al., 2002; SANTANA et al., 2005).

O soro de leite é uma das mais importantes matérias-primas, já que cerca de 20% das proteínas do leite estão no soro, contendo em média 1% de proteína de alto valor nutricional e pequenas quantidades de vitaminas (ABREU, 1999; SILVA,

2000; TEIXEIRA, 2002; CARVALHO, 2006). As proteínas contidas no soro de leite apresentam quase todos os aminoácidos essenciais, apresentando elevadas concentrações de triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina (SGARBIERI, 2004).

Por outro lado, a investigação e busca de substratos alternativos em processos fermentativos são relevantes diante dos impactos técnicos, econômicos, nutricionais e biológicos do reaproveitamento de efluentes industriais. Esta pesquisa é motivada pela necessidade de desenvolvimento de meios de cultura de baixo custo que garantam um bom rendimento de células. Dessa forma, a disponibilidade de carboidratos contidos no soro de leite, além de outros nutrientes, pode viabilizar o seu uso em processos fermentativos. A lactose presente no soro é uma condição para sua utilização como fonte de carbono para crescimento de micro-organismos pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, tornando este subproduto interessante para ser empregado nestes processos (DZIEZAK, 1987; PANESAR, 2010).

Dessa forma, a incorporação do soro de leite em processos fermentativos para a formação de produto com valor agregado, apresenta-se como promissor ramo de pesquisa, com alta aplicabilidade industrial e com alto apelo sustentável. Grande é a quantidade de trabalhos que visam à aplicação de soro de leite como substrato para produção de biomassa e subprodutos da fermentação com células de micro-organismos probióticos: AGUIRRE-EZKAURIATZA et al., 2010; MAHDAVIANI et al., 2011; JONG-KWANG et al., 2011; TANGO; GHALY, 1999; ALONSO et al., 2010; PANESAR et al., 2007; NGUYEN et al., 2003; PESCUA et al., 2012; WEIHUAN et al., 1993; SHAHBAZI et al., 2005), o que reforça a utilização do soro de leite para este fim.

3.4. FATORES IMPORTANTES EM UM PROCESSO FERMENTATIVO

Em processos fermentativos, fatores como a seleção do micro-organismo, estabelecimento de condições ótimas de fermentação, técnicas de separação e purificação do produto de interesse são necessários para o desenvolvimento dos processos que visem à produção de um produto em escala industrial (BAILEY, 1995).

Diversos são os fatores requeridos para o crescimento de micro-organismos, tais como pH, temperatura e concentração de nutrientes (NEOTTI, 2001). Entre os

fatores relacionados à fermentação, podemos destacar os que se referem ao micro-organismo, ao meio de cultivo e ao processo propriamente dito.

Em relação ao micro-organismo, este não deve ser patogênico, deve apresentar um rápido crescimento e uma produção apreciável do produto desejado. Quanto aos meios de cultivo, estes devem ser de baixo custo, acessíveis, devem fornecer os nutrientes necessários, não ter interferência na recuperação do produto e possuir composição química simples. Na condução do processo, algumas variáveis devem ser monitoradas ao longo deste, tais como: temperatura, pH, agitação, aeração e interferentes (BAILEY, 1995; SCHMIDELL, 2001). A otimização do meio de fermentação representa um custo significativo no processo biotecnológico (KENNEDY et al., 1994), tendo como objetivo determinar as condições ideais, de forma a maximizar o rendimento do processo, diminuindo os custos (GOMES, 2010).

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação (SCHMIDELL, 2001). Este estudo é de grande importância, principalmente quando o mesmo é submetido a diferentes condições (PERNI; ANDREW; SHAMA, 2005).

As fontes de carbono geralmente utilizadas em processos fermentativos são a glicose, sacarose, frutose, amido e celulose. Já as fontes comumente utilizadas como fonte de nitrogênio são $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, aminoácidos e uréia (SCHMIDELL, 2001). O extrato de levedura é comumente utilizado como fonte de nitrogênio para crescimento celular, porém seu uso é limitado devido ao seu alto custo. Alguns nutrientes de baixo custo como proteínas hidrolisadas do soro de queijo têm sido utilizados (FITZPATRICK et al., 2003).

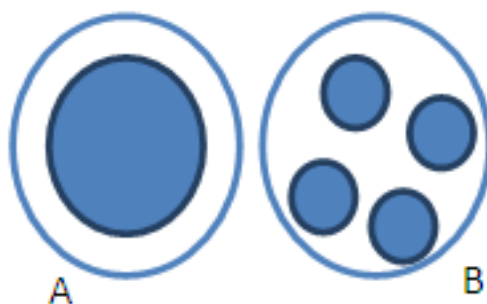
3.5. MICROENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS

A microencapsulação é uma tecnologia baseada no revestimento de partículas (ANAL; STEVENS, 2005; ANAL et al., 2006; KAILASAPATHY; MASONDOLE, 2005). Constitui-se num processo físico no qual pequenas partículas 'núcleo' são envolvidas por um 'material de parede' encapsulante. Segundo Hegenbart (1993), a microencapsulação deve promover as seguintes características, mantendo a sua eficiência em relação ao meio externo:

- ✓ Proteção contra luz, temperatura, umidade e oxigênio;
- ✓ Liberação controlada e gradativa sob condições de pH;
- ✓ Facilidade de manuseio e estocagem.

No processo de microencapsulação podem ser produzidos dois tipos básicos de estruturas: a microcápsula, onde a partícula é formada de um único núcleo e está envolvida por uma fina parede (Figura 2A); e a microesfera, onde o material encapsulado está uniformemente distribuído (Figura 2B).

Figura 2 -Microcápsula (A); Microesfera (B)



Fonte: A autora

Inúmeras são as técnicas aplicadas com o propósito de prover formas convenientes e estáveis de substâncias com propriedades bioativas. O grande desafio é selecionar a mais eficiente e apropriada, considerando o tipo de material de revestimento, a espécie bacteriana e a aplicação a que será destinada (ANAL; SINGH, 2007).

A seleção do método de encapsulação é realizada em função: (i) do tamanho médio da partícula que se espera obter; (ii) das propriedades físicas do agente encapsulante; (iii) do organismo ou substância a ser encapsulada; (iv) da aplicação do material após a encapsulação; (v) do mecanismo de liberação; (vi) do custo; (vii) da estabilidade da atividade biológica; (viii) da eficiência da encapsulação.

Dentre os métodos de microencapsulação existentes, podemos citar: dupla emulsão, evaporação de solventes, coacervação, extrusão, leite fluidizado, secagem em tambor, inclusão molecular, liofilização e secagem por atomização (*spray drying*). Através do processo de microencapsulação é possível converter líquidos em sólidos,

mascarar odor e sabor, conferir proteção e estabilidade dos fármacos e resolver problemas de instabilidade e inviabilidade dos probióticos (SULTANA et al., 2000; FÁVARO-TRINDADE, 2008; SHI; TAN, 2002).

Vale salientar que nem todas as técnicas se adequam à encapsulação de probióticos, pois algumas utilizam solventes orgânicos ou empregam agentes encapsulantes que afetam as características sensoriais dos alimentos. Outro fator limitante é o tamanho das células (1 a 5 μm), que impede a obtenção de partículas em escala nanométrica (FÁVARO-TRINDADE, 2011).

O custo para utilização do ingrediente encapsulado também é considerado um fator limitante no emprego da encapsulação na indústria alimentícia. De acordo com Gouin (2004), sugere-se que não seja ultrapassado um custo adicional de € 0,1/kg ao alimento.

Um ponto importante na utilização dos alimentos funcionais acrescidos de micro-organismos é a obtenção de um efeito contínuo, pois os probióticos devem ser ingeridos diariamente para que apresentem os benefícios fisiológicos esperados. Para assegurar as suas propriedades terapêuticas, um dos desafios é a passagem pelo trato gastrointestinal, que envolve a exposição ao pH estomacal, sais biliares e enzimas, representando a maior barreira à sua sobrevivência (CHAMPAGNER, GARDNER, ROY, 2005). Dessa forma, a obtenção de micro-organismos que resistam à passagem por essa barreira é de grande interesse nutricional e tecnológico (KAILASAPATHY, 2003), sendo necessária a busca por métodos que possam proteger a sua integridade (LISERRE; RÉ ; FRANCO, 2007) e proporcionem resistência a fatores ambientais, como calor, oxigênio e umidade.

Portanto, o uso de revestimentos capazes de propiciar resistência às condições adversas pode permitir, por exemplo, que os ingredientes ativos consigam passar pelo estômago (ANAL et al., 2003; ANAL; STEVENS, 2005), aumentando a resistência dos micro-organismos a condições extremas de pH (SHAH; RAVULA, 2000; SHEU, MARSHAL, 1993) ou de calor e umidade (O'RIORDAN et al., 2001). Em adição, a microencapsulação permite a manutenção da viabilidade, estabilidade e protege o produto dos métodos de processamento e armazenamento.

A encapsulação também é empregada para melhorar características organolépticas, como o sabor e aroma. Outra vantagem é o que chamamos de liberação controlada, onde a liberação do material contido no núcleo da cápsula ocorre lentamente ou a partir da ocorrência de determinado evento. Favorece ainda

a estabilização do material central quanto às reações oxidativas e protege quanto a perdas nutricionais (RISCH, 1995; CAI et al., 2000; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002; OLIVEIRA, 2006; O'RIORDAN et al. 2001; SULTANA et al., 2000).

Sob a ótica da indústria, as bactérias probióticas microencapsuladas são aplicadas em produtos diversos. A microencapsulação facilita a manufatura destes produtos, garantindo a manutenção das características e estabilidade quanto ao armazenamento (ANAL; SINGH, 2007).

Dentre as técnicas empregadas para a microencapsulação, a mais utilizada é a secagem em *spray drying*, principalmente tratando-se de culturas com alta concentração de micro-organismos.

3.6. SPRAY DRYING

A secagem por atomização com a utilização do *spray dryer* vem sendo utilizada há décadas, sendo que as primeiras descrições datam de 1860, com oficialização da primeira patente já no ano de 1872. A atomização é uma técnica relativamente barata e um dos métodos de encapsulação mais antigos, tendo sido utilizada já na década de 30 na preparação dos primeiros compostos encapsulados (DIZIEZAK, 1988).

O método consiste na transformação de um material em estado líquido, na forma de soluções, emulsões e suspensões, para o estado sólido, formando pós finos e secos. A secagem é feita em operação contínua através de meio aquecido (MASTERS, 1985).

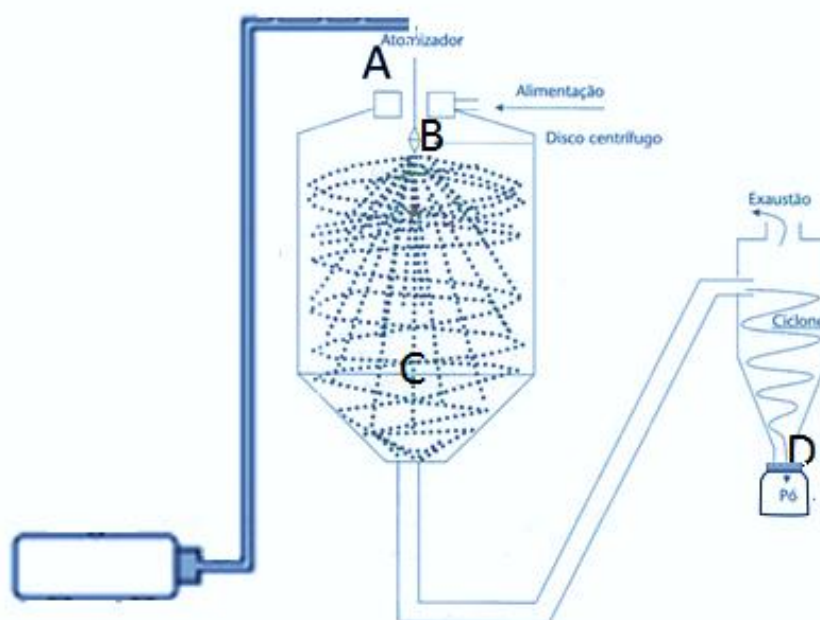
A técnica de microencapsulação por *spray drying* é a mais empregada para a encapsulação de ingredientes alimentícios (FÁVARO-TRINDADE, 2011). Apresenta a vantagem de ser um processo econômico e flexível, produzir um produto de boa qualidade (DZIEZAK, 1988), ter grande disponibilidade de equipamentos (SILVA et al., 2002), produzir grande quantidade de produto seco e permitir ainda a utilização de uma grande quantidade de materiais encapsulantes, os chamados materiais de parede (RÉ, 1998).

A Figura 3 mostra, de forma esquemática, o processo de secagem por *spray drying*. O método consiste basicamente na atomização de uma mistura sólido-fluido que é submetida a um fluxo de ar quente (co-corrente, contracorrente ou misto) na câmara de secagem, promovendo assim a evaporação do solvente e levando a

formação de um produto seco (SOUZA, 2003). As partículas sólidas secas são então separadas por um ciclone e recolhidas na forma de um pó.

O equipamento possui um sistema de bombeamento, por onde a suspensão é aspirada até a região A, onde há um sistema de aquecimento do ar de entrada. Localizado na região B existe um bocal (bico atomizador), que possui saída para a suspensão e o ar. A atomização é iniciada quando a suspensão, sob efeito da compressão do gás, entra pelo pequeno orifício do bico atomizador, formando pequenas gotículas. Este representa um dos pontos críticos do processo, já que o tamanho da gota formada determina o tamanho da partícula. A atomização é realizada usando-se um sistema centrífugo ou de alta pressão, e as gotículas atomizadas imediatamente entram em contato com um fluxo de ar quente na câmara de secagem (C), transformando-se em partículas sólidas (MAFART, 1994). Pela formação de um sistema de sucção o gás movimenta-se de forma circular, formando um movimento de ciclone que encaminha as partículas secas para o recipiente coletor (D).

Figura 3-Diagrama esquemático do funcionamento de um *spray dryer*.



Fonte: Adaptado de Pessoa, Júnior e Kilikian (2005).

A atomização envolve a geração de um grande número de gotículas a partir de um fluido, resultando no aumento na relação área / volume e permitindo uma rápida remoção da umidade (LEFEBVRE, 1989). Aumentando-se a área superficial

entre a gota e o meio de secagem, o tempo de exposição das partículas ao calor é curto, fazendo com que a temperatura do núcleo não ultrapasse 100 °C. Quando o ar quente entra em contato com a partícula úmida, ocorre a desidratação quase que instantânea da gotícula. Além disso, o aquecimento e a transferência de massa durante o processo de secagem ocorrem ao redor das gotículas formadas, criando uma proteção de vapor ao redor destas. Devido a estes fatores, esta técnica pode ser empregada em produtos termosensíveis (LANNES; MEDEIROS, 2003; OAKLEY, 1997; DZIEZAK, 1988; DAIUTO; CEREDA, 2003).

Considerando que os micro-organismos são sensíveis as temperaturas utilizadas nos processos de secagem (CHÁVARRI et al., 2010), uma forma de amenizar este problema é a utilização de um adjuvante, que é uma substância protetora que visa garantir a estabilidade dos mesmos durante a vida útil do produto (ROKKA; RANTAMAKI, 2010).

A escolha do material encapsulante deve levar em consideração fatores como: porosidade, solubilidade, viscosidade, transição vítrea, formação de filme e fatores econômicos (BRAZEL, 1999). São utilizados no encapsulamento carboidratos, goma arábica (acácia), goma mesquita, amido, maltodextrinas, gelatina, alginato, quitosana, derivados de celulose e carragena (DZIEZAK, 1988; RANDALL et al. 1988; ANDERSON et al., 1985; JACKSON; LEE, 1991; BERISTAIN, 1995; KENYON, 1995). O agente encapsulante deve formar um filme coesivo com o material a ser encapsulado e não reagir com o núcleo, oferecendo propriedades desejáveis de revestimento, tais como resistência e estabilidade (DONBROW, 1992).

Dificuldades na secagem de materiais ricos em açúcar estão associadas à presença de ácidos e açúcares de baixo peso molecular. Com a rápida remoção da umidade são formados produtos amorfos que apresentam regiões cristalinas (BHANDARI; DATTA; HOWES, 1997). O estado amorfo é caracterizado por uma alta higroscopicidade, que acarreta o que denominamos de *sticky* (pegajoso), formando aglomerados de alta consistência (SHAHIDE; HAND, 1993).

Uma das características que justifica a larga utilização da secagem por *spray drying* e a busca pela otimização de seus parâmetros é a elevada qualidade do pó obtido em relação a sua granulometria, umidade final, homogeneidade, densidade, forma e índice de solubilidade (REMILI et al., 1994; SOUZA, 2003).

As características finais do pó a serem consideradas em um estudo de escalonamento são a umidade final, o tamanho da partícula, a densidade e a coesão

entre as partículas (BIRCHAL et al., 2005), sendo que os pós obtidos são geralmente esféricos e porosos (POMBRIRO, 1998; WALTON, 2000).

A qualidade dos produtos formados pela atomização depende das características do atomizador, da transferência de calor e massa entre o ar aquecido e as gotículas contidas na câmara de secagem (FURUTA et al., 1994), da velocidade de secagem, da pressão operacional e das temperaturas de entrada e saída do ar (GOULA; ADAMOPOULOS, 2005). As propriedades físico-químicas do pó produzido dependem das características do líquido de alimentação (viscosidade, tamanho das partículas, concentração de sólidos, vazão), assim como do ar de secagem e do tipo de atomizador. A distribuição do tamanho das partículas varia com a geometria do bico utilizado, com a velocidade de alimentação e a temperatura de ar de entrada. Sendo assim, estas são variáveis importantes na otimização do processo de secagem para a obtenção de um produto de boa qualidade e de bom rendimento (TONON et al., 2009).

3.6.1. FATORES QUE INFLUENCIAM A SECAGEM POR *SPRAY DRYING*

Na otimização da secagem por *spray drying*, aspectos como o aquecimento, volume de ar, tipo do bico atomizador, vazão do material e temperatura do ar de secagem devem ser considerados (LANNES; MEDEIROS, 2003).

De acordo com os estudos de Furuta et al. (1994), a qualidade do pó obtido na secagem é dependente das características do atomizador e da transferência de calor e massa entre o ar aquecido e as gotículas na câmara de secagem. Propriedades de instantaneidade, como a molhabilidade e solubilidade, são influenciadas pelo teor de sólidos na suspensão a ser seca assim como o tipo de *spray*, velocidade de secagem e as temperaturas do ar de entrada e saída (NATH; SAPTHY, 1998). Variáveis do processo de secagem como viscosidade da suspensão, vazão de entrada, temperatura e pressão do ar de secagem são importantes para obtenção de produtos secos de boa qualidade (TONON et al., 2008).

Outros fatores relevantes na formação do produto final seco são a umidade e a atividade de água (STRAATSMA et al., 1999). A umidade é um indicativo da eficiência do processo de desidratação, enquanto que o estudo da atividade de água pode ser feito através das isotermas de sorção (BROD, 2003), que permitem

previsões da estabilidade do produto durante seu acondicionamento e armazenamento (Hossain et al., 2001).

De acordo com Carvalho (1994), a atividade de água (A_w) é de fundamental importância, visto que, através da sua avaliação, podem ser previstas as reações químicas, enzimáticas e microbiológicas que podem deteriorar o produto seco.

Algumas características dos açúcares influenciam diretamente as propriedades dos pós formados. Dentre estas podem ser citadas a higroscopicidade, solubilidade, ponto de fusão e temperatura de transição vítrea (T_g). Medidas da umidade do ar de exaustão, temperatura, vazão de alimentação e umidade do gás de entrada podem ser usadas para prever e melhorar a eficiência do processo de secagem. Segundo Timbers et al. (1997), a umidade relativa do ar do processo é uma variável significativa no controle do secador.

Alguns produtos termosensíveis requerem atenção especial no projeto e operação do equipamento. Geralmente a deposição das partículas no interior da câmara de secagem é um dos principais problemas encontrados na secagem por atomização. Este fato influencia diretamente a taxa de sobrevivência dos micro-organismos, pois esse depósito aumenta o tempo de residência e assim acarreta a inativação térmica das células microbianas (LIEVENSE; VAN'T RIET, 1993). A secagem de produtos ricos em açúcares de baixo peso molecular confere natureza pegajosa ao pós obtidos (JAYA; DAS, 2009), levando com que haja aderência e ocasionando baixos rendimentos. Contudo, a incorporação de adjuvantes de secagem de alto peso molecular pode solucionar esse problema (TURCHIULI et al., 2011).

Os sistemas biológicos por serem termolábeis requerem atenção especial no processo de secagem. O processo de desidratação afeta, por exemplo, a sobrevivência dos micro-organismos, induzindo drásticas perturbações na variação de volume celular (JOSHI; THORAT, 2011).

Nos processos que utilizam a desidratação como fator de conservação, é de grande interesse o conhecimento da temperatura de transição vítrea (T_g), pois fatores como cristalização, pegajosidade e compactação estão diretamente relacionadas à T_g (ROOS, 2010). São muitos os trabalhos voltados para determinação e avaliação da T_g em produtos desidratados, uma vez que esse serve de indicador de estabilidade (MESTRY; MUJUMDAR; THORAT, 2011; TONON et al., 2009).

Tratando-se especificamente da secagem de culturas probióticas por *spray drying*, parâmetros específicos devem ser avaliados a fim de conferir uma maior proteção às células, tais como: tolerância do micro-organismo ao estresse; agente encapsulante; temperatura de secagem; tempo de secagem; atividade de água (A_w) e condições de estocagem do produto (CHÁVEZ e LEDEBOER, 2007). A vantagem na aplicação da técnica por atomização para produção de probióticos em pó é evidenciada pelos inúmeros e recentes trabalhos divulgados (RIZQIATI et al., 2008; SIMPSON et al., 2005; PICOT; LACROIX, 2003; FRITZEN-FREIRE et al., 2012; ANEKELA et al., 2013; GARDINER et al., 2000; IVANOVSKA et al., 2012; RAWEE et al., 2012; GOLOWCZYC et al., 2012; DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012; CAI ET AL., 2012; PAEZ et al., 2012; RIVEROS et al., 2009; ZHAO et al., 2008; SILVA et al., 2011; PEIGHAMBARDoust et al., 2011).

3.6.2. MALTODEXTRINA COMO AGENTE ENCAPSULANTE

A natureza do material encapsulante é um dos fatores que mais influenciam nas técnicas de microencapsulação (ROSENBERG et al., 1990). Diversos são os materiais utilizados como encapsulantes, podendo ser de origem natural, semi-sintética ou biodegradável. Dentre estes, podem-se citar goma arábica, alginato, quitosana, carragena, carboidratos, gelatina, amido, maltodextrina, proteínas e os derivados de celulose (JACKSON; LEE, 1991; OLIVEIRA; PETROVICK, 2012).

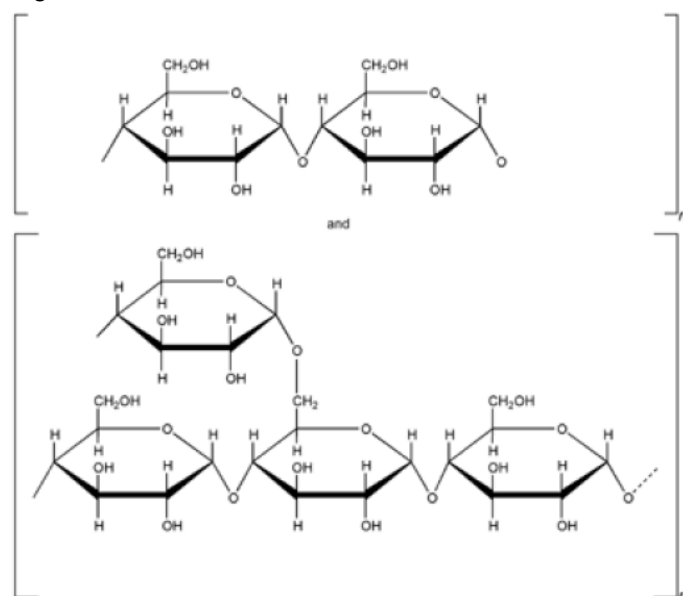
O encapsulante deve formar um filme coesivo com o material a ser encapsulado e não reagir com o material do núcleo da microcápsula (DONBROW, 1992). A concentração do agente encapsulante pode afetar a sobrevivência de micro-organismos, uma vez que uma maior quantidade de sólidos resulta em um tamanho maior de partículas, e assim um maior tempo de secagem (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007). Portanto, um estudo detalhado da utilização desses agentes deve ser realizado.

O uso de excipientes como ‘material de parede’ no processo de microencapsulação por *spray dryer* é de prática comum. Um dos materiais mais utilizados como encapsulante na secagem por atomização é a maltodextrina, isso devido ao seu baixo custo e baixa higroscopicidade, o que evita a aglomeração de partículas (ANSELMO, 2006). A maltodextrina de batata foi o primeiro produto comercial no mercado, apresentando capacidade de formar um gel suave e

reversível e sendo aplicado como substituto parcial da gordura em sorvetes e molhos para saladas. Desde então, várias maltodextrinas têm sido produzidas para diversas aplicações (KENNEDY; KNILL; TAYLOR, 1995).

A maltodextrina é um polímero de glicose ($C_6H_{10}O_5$)_n.H₂O com peso molecular variado (Figura 4). É um produto obtido a partir da hidrólise parcial do amido, podendo ser obtida de amidos de diferentes fontes botânicas.

Figura 4-Estrutura molecular da unidade de maltodextrina.



Fonte: Rowe, Sheskey e Owen (2006).

Diferentemente do amido nativo, a maltodextrina é solúvel em água (CHRONAKIS, 1998). Pode ser diferenciada pelo valor de dextrose equivalente (DE), que reflete o seu poder redutor, sendo expresso em gramas de glicose por 100 g de maltodextrina. Características como a solubilidade, higroscopicidade, sabor doce e compressibilidade aumentam com o valor de DE (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006).

A eficácia de maltodextrinas de baixa DE como agente encapsulante deve-se a sua baixa difusividade de umidade (ADHIKARI et al., 2004). Tonon et al. (2008) demonstraram em seus estudos sobre o pó de açaí obtido em *spray drying* que há uma relação direta dos menores valores de higroscopicidade como o aumento da concentração de maltodextrina. O papel das maltodextrinas como veículo de secagem justifica-se pelo auxílio da dispersão, evitando a aglomeração do produto nas tubulações do *spray*. Além disso, confere ao produto seco granulação

homogênea e garantia de boa dispersão do produto em água ou solvente (ALEXANDER, 1992).

As maltodextrinas também são utilizadas como agentes geleificantes e espessantes, previnem a cristalização, auxiliam na dispersibilidade e controlam o congelamento (CHRONAKIS, 1998). Em geral, as maltodextrinas são solúveis em água, possuem baixa densidade, não apresentam sabor adocicado e não possuem sabor de amido (COUTINHO, 2010)

De maneira geral, são as propriedades dos agentes encapsulantes que determinam os mecanismos de liberação dos probióticos das cápsulas. Encapsulantes solúveis em água liberam seu conteúdo, quando se adiciona água, devido à mastigação ou durante a digestão (quando são digeríveis) (FÁVARO-TRINDADE, 2011).

3.7. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS

Nos últimos anos é cada vez maior a incorporação de técnicas de planejamento experimental através de ferramentas matemáticas. Novas teorias e metodologias tem sido amplamente utilizadas, e com o planejamento é possível obter o máximo de informações através de um número mínimo de experimentos, criando uma estrutura bem definida quanto aos fatores de estudo, unidades e modelos estatísticos (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 1996; WILLERS et al., 2008; PERÀZIO, 2010). Sua aplicação tem aumentado cada vez mais em estudos biológicos e em pesquisa médica (LEON, 2012; LI, 2003), sendo utilizado para minimizar o número de experimentos e otimizar os processos, tendo como base a análise estatística (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2003).

Os avanços do planejamento experimental são ferramentas poderosas de elucidação, aplicação e interpretação de experimentos científicos. Com um bom planejamento é possível obter-se exatamente o tipo de informação que se procura. Entretanto, se deve conhecer muito bem o processo e os efeitos das respostas de interesse, podendo estas ser quantitativas ou qualitativas. A literatura relata estudos que contemplam diversos fatores simultâneos (*planejamentos multivariáveis*) e os correlacionados à variação de um único fator por vez (*planejamentos univariáveis*).

Os planejamentos multivariáveis são mais elucidativos quando comparados aos univariáveis (FRANCIS et al., 2003; FERREIRA et al., 2007).

De maneira geral, os planejamentos experimentais trabalham as chamadas variáveis independentes (X) em diferentes níveis (n). Um exemplo aplicado ao objeto de estudo do presente trabalho seria a formulação de microcápsulas de *L. casei*, onde dois fatores seriam selecionados para o estudo, a temperatura de entrada do ar e a concentração de agente encapsulante, sendo que ambos seriam estudados nos níveis codificados como baixo (-1) e alto (+1).

O objetivo de um planejamento de experimentos é a identificação de parâmetros importantes que resultem em menor número de experimentos (PEIXOTO, 2005). O primeiro passo é a construção de uma tabela com combinações dos parâmetros envolvidos, e o segundo passo é ajustar uma superfície de resposta aos experimentos selecionados (BARROS NETO, BRUNS; SCARMINIO, 1996). Quando ainda se tem o interesse de otimizar um processamento, isto é, maximizar ou minimizar algum tipo de resposta, utiliza-se a metodologia de superfície de resposta (RSM) (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2003)

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é o conjunto de técnicas estatísticas que exploram e constroem modelos matemáticos, permitindo a correlação das respostas obtidas de um planejamento a fatores que afetam o estudo. Essa relação permite a associação em níveis intermediários de respostas que não foram realizadas experimentalmente (MUTHUKUNAR; MOHAN; RAJENDRAN, 2003).

A MSR é composta de duas etapas: a modelagem, que é obtida ajustando-se modelos lineares ou quadráticos a resultados experimentais obtidos a partir de planejamentos experimentais; e o deslocamento, que busca o caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é o caminho onde a resposta varia de forma mais pronunciada. Tais etapas são necessárias para que se atinja a região ótima da superfície estudada. A MSR é capaz de detectar efeitos quadráticos, o que possibilita verificar a curvatura da região experimental (NIST/ SEMATECH, 2011), permitindo aproximar um modelo empírico a uma relação entre os fatores e as respostas do processo (PERÀZIO, 2010).

Existe uma grande quantidade de estratégias que podem ser adotadas para execução de planejamentos experimentais e metodologias de estudo das MSR,

cada qual como suas particularidades que dependem da situação problema que se pretende avaliar. Dentre os planejamentos podemos citar o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). O DCCR é aplicado quando uma função matemática de primeira ordem não é capaz de se ajustar a superfície de resposta. Resumidamente, o DCCR é um planejamento em estrela onde a distância do centro do delineamento até os pontos axiais garante a rotabilidade, sendo aplicado quando as variâncias das predições das respostas dependem apenas da distância ao ponto central, isto é, quando todos os pontos forem equidistantes do ponto central (PERÀZIO, 2010).

4. METODOLOGIA

4.1. SORO DE LEITE

O soro de leite foi gentilmente cedido pela empresa Natural da Vaca®, localizada em Gravatá- PE. Recolheu-se o soro resultante da última etapa de processamento do queijo tipo ricota, e em seguida a amostra foi homogeneizada, armazenada em recipientes plásticos de 2 litros de capacidade, identificada e posteriormente congelada.

4.1.1. CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE LEITE

A caracterização do soro de leite utilizado na formulação do meio de cultura para a fermentação de *L. casei* foi realizada por meio da determinação de pH, umidade, proteínas e lipídios de acordo com os Métodos Analíticos Oficiais (INSTITUTO ADOLPHO LUTZ, 2008). Os ensaios foram realizados em triplicata.

A acidez titulável do soro de leite foi determinada através de titulação com solução Dornic (indicador fenolftaleína a 1,0 %), e os resultados expressos em Graus Dornic (°D) (IAL, 2008).

4.2. MANUTENÇÃO DO MICRO-ORGANISMO

Foi adquirida uma cepa de *L. casei* proveniente da coleção de culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEA). As células foram armazenadas em tubos inclinados com meio MRS Ágar suplementado com 2% (p/v) de glicose. A cultura foi armazenada sob refrigeração a 10 °C, sendo realizados repiques periódicos a cada 15 dias para manutenção das células. O micro-organismo também foi submetido ao método de liofilização, sendo armazenado em frascos contendo aproximadamente 2 mL da suspensão de células.

4.3. PROCEDIMENTOS DE FERMENTAÇÃO

4.3.1. PRÉ-INÓCULO E INÓCULO

Foi preparado um pré-inóculo por meio da inoculação do micro-organismo em tubo contendo 5 mL de solução salina estéril (0,85% p/v de NaCl) até obtenção de turbidez equivalente ao tubo de número 0,5 da escala de McFarland.

Posteriormente, o inóculo foi preparado utilizando-se frasco tipo Erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 45 mL de meio caldo MRS suplementado com 2% (p/v) de glicose. A composição do meio caldo MRS está apresentada na Tabela 3. O meio foi esterilizado em autoclave a 120 °C por 15 minutos.

Ao inóculo foi adicionado o volume de 5 mL do pré-inóculo (concentração de 10% v/v), sendo o cultivo realizado na condição estacionária e incubação em estufa a 37 °C por 12 horas.

Tabela 3- Composição do meio caldo MRS.

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO (g/L)
Peptona	10
Extrato de carne	10
Extrato de levedura	5
Dextrose	20
Polisorbato 80	1
Citrato de amônio	2
Acetato de sódio	5
Sulfato de magnésio	0,1
Sulfato de manganês	0,05
Fosfato dipotássio	2
Ágar	12

4.3.2. COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA- CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NO MEIO À BASE DE SORO DE LEITE

Inicialmente, seis meios alternativos à base de soro de leite, denominados de meios A, B, C, D, E e F foram submetidos ao processo fermentativo. Os referidos meios foram formulados a partir de diferentes concentrações de glicose (g/L), visando avaliar a melhor concentração deste açúcar em relação à concentração final de células viáveis no caldo fermentado. Testou-se o meio à base de soro de leite com as seguintes concentrações: 5, 10, 20, 30 e 40 g/L de glicose. Cabe ressaltar que ao meio A não houve suplementação de glicose, conforme mostra a Tabela 4. Para a preparação dos meios, o próprio soro de leite foi utilizado como solvente dos compostos.

Tabela 4-Composição dos meios à base do soro de leite empregados nos experimentos de determinação da concentração de glicose.

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO (g/L)
MnSO ₄ .H ₂ O	0,05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,10
Citrato de sódio	2,00
Acetato de sódio	5,00
K ₂ HPO ₄	2,00
Glicose	0,0/5,0/10,0/20,0/30,0/40,0
Tween 80	1,00
Extrato de levedura	25,00
Soro de leite	Volume de 1000 mL

Os cultivos foram realizados empregando-se uma concentração de inóculo de 5% (v/v) em cultivo estacionário, utilizando-se frascos tipo Erlenmeyer de 500 mL de capacidade contendo 200 mL de meio, a 37 °C por 20 horas. Os experimentos foram realizados em duplicata e avaliou-se ao término da fermentação a concentração de células viáveis e o pH.

4.4. AVALIAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO

4.4.1. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *L. CASEI* EM MEIO À BASE DE SORO DE LEITE

Após a definição da concentração de glicose a ser adicionada, realizou-se a fermentação para obtenção do padrão cinético da fermentação. Esta foi conduzida empregando-se uma concentração de inóculo de 5% (v/v) em cultivo estacionário, utilizando-se frascos tipo Erlenmeyer de 500 mL de capacidade contendo 200 mL de meio, a 37 °C por 43 horas. O processo foi monitorado através das análises de pH e concentração de células viáveis. Os cultivos foram realizados em triplicata.

4.4.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS

A partir de diluições decimais seriadas das amostras (1 mL de caldo fermentado e 0,1 g de pó) em tubos de ensaio contendo solução salina estéril (0,85% p/v de NaCl), um volume de 10 µL das amostras foi inoculado em placas de Petri contendo meio MRS Ágar suplementado com 2% (p/v) de glicose pela técnica “pour plate”. As placas foram incubadas em estufa por 72 horas, a 37 °C.

4.4.3. DETERMINAÇÃO DO PH

O pH das amostras foi determinado por potenciometria (Marconi[®]).

4.4.4. PESQUISA DE CONTAMINANTES

Foi realizada microscopia a fresco, técnica de Gram e inoculação em meio MRS Ágar para verificação de possíveis contaminantes.

4.4.5. TEOR DE SÓLIDOS SOLÚVEIS (SST)

O teor de SST foi determinado por refratometria, através do refratômetro digital (Atago Modelo PAL-3). Os resultados foram expressos em °Brix.

4.5. MICROENCAPSULAÇÃO POR *SPRAY DRYING*

A secagem por *spray drying* foi realizada em equipamento secador com sistema atomizador em bicos – mini *spray dryer* (SD-Basic) (Figura 5). O equipamento dispõe de um sistema de atomização, soprador, aquecedor, câmara principal de 215 mm x 500 mm e ciclone. Possui uma capacidade de evaporação de água de até 1L/h, com temperatura máxima de entrada de 200 °C e circulação de ar seco de 70 m³/h.

Testes preliminares foram realizados para definir as faixas de operação para a temperatura do ar de entrada e seleção do adjuvante de secagem a ser investigado. Foram utilizados como adjuvantes de secagem: maltodextrina, Tween 80, amido de milho, fosfatidilcolina, pectina e soro de leite *‘in natura’*. Foram excluídos ensaios que obtiveram teor de umidade acima de 4% e atividade de água acima de 0,6 (ALZAMORA et al., 2003; MASTERS, 1985). Ensaios prévios também

foram realizados a fim de avaliar quais as melhores condições de gotejamento da amostra.

Figura 5 - Foto do secador Mini Spray Dryer (SD-Basic).



Fonte: A autora

O adjuvante de secagem foi dissolvido no caldo fermentado por meio de um agitador magnético (RH BASIC KT/C SAFETY CONTROL IKAMAGI), até sua completa dissolução. Imediatamente após o preparo das suspensões, alíquotas de 1 mL foram retiradas para avaliação de possíveis contaminantes do processo (Item 4.5.4) e a concentração de células viáveis.

Em seguida, a suspensão foi atomizada no secador sob condições operacionais constantes, e as partículas em pó produzidas foram separadas da corrente gasosa, sendo coletadas em um recipiente de vidro. Os materiais produzidos foram acondicionados em recipientes de vidro hermeticamente fechados e guardados em dessecador com sílica para não absorver umidade do ar ambiente. Empregou-se um bico atomizador de diâmetro de 1,5 mm.

Definidas as faixas de operação de temperatura, empregou-se um planejamento experimental do tipo DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional), com 2 variáveis (temperatura de entrada do ar e concentração de adjuvante (m/v%), tendo como variável resposta a concentração de células viáveis

ao final da secagem, expressa em UFC/g. Os planejamentos foram realizados com quatro pontos axiais e triplicata no ponto central, totalizando 11 experimentos. Foram verificadas durante o processo de secagem a temperatura de saída e o tempo de secagem. As Tabelas 5 e 6 resumem os planejamentos utilizados.

Tabela 5 - Primeiro planejamento do tipo DCCR empregado nos ensaios de secagem por spray drying (2 variáveis, pontos axiais com $\alpha = \pm 1,41$, triplicata no ponto central).

Ensaio	TEMPERATURA DE	CONCENTRAÇÃO DO
s	ENTRADA (°C)	ADJUVANTE (m/v%)
1	-1 (77,3)	-1 (3,8)
2	+1 (112,7)	-1 (3,8)
3	-1 (77,3)	+1 (17,2)
4	+1 (112,7)	+1 (17,2)
5	-1,41 (70)	0 (10,5)
6	+1,41 (120)	0 (10,5)
7	0 (95)	-1,41 (1)
8	0 (95)	+1,41 (20)
9	0 (95)	0 (10,5)
10	0 (95)	0 (10,5)
11	0 (95)	0 (10,5)

Tabela 6 - Segundo planejamento DCCR empregado nos ensaios de secagem por *spray drying* (2 variáveis, pontos axiais com $\alpha = \pm 1,41$, triplicata no ponto central).

Ensaio	TEMPERATURA DE	CONCENTRAÇÃO DO
s	ENTRADA (°C)	ADJUVANTE (m/v%)
1	-1 (52,9)	-1 (7,9)
2	+1 (67,1)	-1 (7,9)
3	-1 (52,9)	+1 (22,1)
4	+1 (67,1)	+1 (22,1)
5	-1,41 (50)	0 (15)
6	+1,41 (70)	0 (15)
7	0 (60)	-1,41 (5)
8	0 (60)	+1,41 (25)
9	0 (60)	0 (15)
10	0 (60)	0 (15)
11	0 (60)	0 (15)

4.6. CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCAPSULAS

4.6.1. CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS DOS PÓS OBTIDOS POR *SPRAY DRYING*

Visando determinar o efeito das condições de secagem sobre a viabilidade celular do micro-organismo, foram feitas contagens de células viáveis nos pós obtidos após os processos de secagem, segundo metodologia descrita no item 4.5.2. Neste caso, foram preparadas suspensões dos pós do micro-organismo a partir de uma massa de 0,1 g do pó.

4.6.2. SOLUBILIDADE

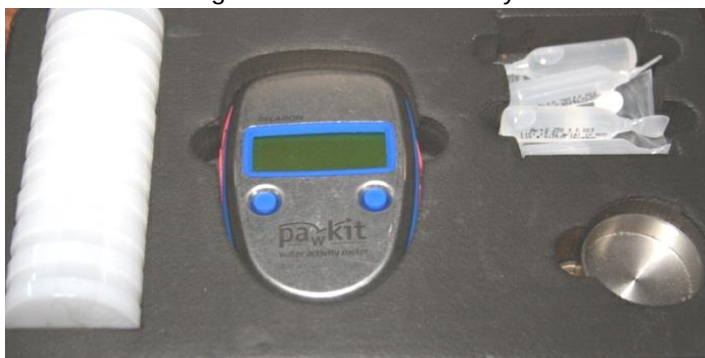
A solubilidade foi determinada de acordo com EASTMAN & MOORE (1984). Uma massa correspondente a 1 g de amostra seca foi diluída em 100 mL de água destilada. Após homogeneização da suspensão em um mixer em alta velocidade durante 5 minutos, a amostra foi centrifugada a 30.000 x g durante 10 minutos. Amostras de 20 mL da solução centrifugada foram distribuídas em placas de Petri e submetidas à secagem em estufa a vácuo a 75 °C por 5 horas. A solubilidade foi

calculada, em termos percentuais, por diferença de peso. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6.3. ATIVIDADE DE ÁGUA

A atividade de água (A_w) foi determinada nos pós após secagem e durante a avaliação do tempo de estocagem. Foi utilizado o equipamento Pa_wKit Water Activity Meter[®] (Figura 6), de acordo com as instruções do fabricante. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 6- Medidor de Atividade de Água PawKit Water Activity Meter[®].



Fonte: A autora

4.6.4. MOLHABILIDADE

Esta propriedade foi medida segundo metodologia descrita por Vissotto et al. (2006). O método consiste na queda de 2,0 g de amostra sobre 400 mL de água destilada a 25 °C, em béquero de 600 mL, e medição do tempo necessário para que todas as partículas molhassem, determinado visualmente. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6.5. HIGROSCOPICIDADE

Uma massa de 2 g da amostra foi colocada em cápsulas de alumínio contendo uma solução saturada de NaCl a temperatura ambiente (umidade relativa de 75%) até que o equilíbrio fosse atingido. A higroscopicidade foi expressa como conteúdo de água absorvida por 100 g de pó em base seca (g/ 100 g em b.s). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6.6. TEOR DE UMIDADE

A umidade dos pós (X_p) foi determinada segundo a metodologia descrita pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008). Uma massa de 5 g do pó foi levada a estufa por 3 horas a temperatura de 105 °C. Após resfriamento em dessecador, a massa foi pesada e o procedimento repetido até obtenção de peso constante (m_{pesocte}). A umidade foi calculada por meio da Equação 1. Os ensaios foram realizados em triplicata.

$$X_p = \left[\frac{5}{m_{\text{pesocte}}} \right] - 1\% \text{ Sobrevivência} = \frac{N}{N_0} \times 100$$

$$X_p = \left[\frac{5}{m_{\text{pesocte}}} \right] - 1 \quad (1)$$

4.6.7. ESTABILIDADE DAS CÉLULAS DE *L. CASEI* ENCAPSULADAS DURANTE ESTOCAGEM – VIDA DE PRATELEIRA (*SHELF LIFE*)

As microcápsulas de *L. casei* foram estocadas em frascos de penicilina hermeticamente fechados e acondicionados em dessecador. Foi avaliada a influência da temperatura de armazenamento (4 °C, -8 °C e temperatura ambiente - ± 30 °C) sobre a viabilidade e a umidade final dos pós. Os experimentos foram realizados em triplicata por um período de 60 dias. A sobrevivência dos probióticos foi avaliada como descrito no item 4.4.2 após T_0 , t_7 , t_{14} , t_{28} , t_{42} e t_{60} dias de estocagem do produto.

4.6.8. ANÁLISE TÉRMICA

Inicialmente, os equipamentos DTA 60 e DSC 60 (SHIMADZU®) foram calibrados seguindo as normas do fabricante, a fim de obterem-se resultados mais precisos. As amostras foram mantidas em dessecador até sua pesagem e acondicionamento em micro-cadinhos. Os equipamentos foram dotados de cadinho de referência (vazio de mesmo material ao da amostra). Para obtenção das curvas foi utilizado o programa TA 60 (SHIMADZU®).

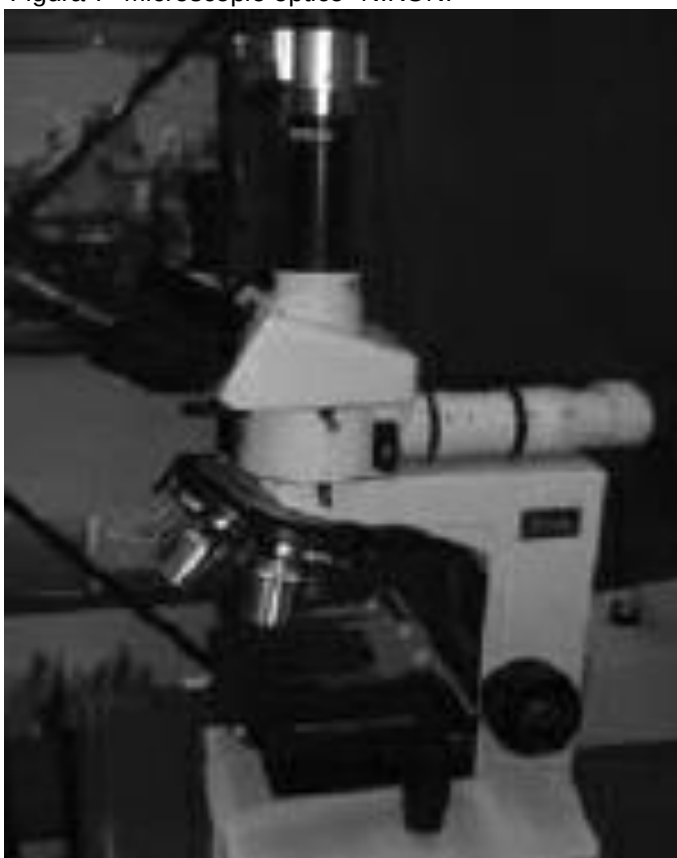
A DTA foi realizada nas seguintes condições, tanto para o ensaio da maltodextrina quanto do pó seco de probióticos: massa da amostra de aproximadamente 10,0 mg; razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, de 30 °C a 250 °C. Com o objetivo de obter a entalpia das amostras, a DSC foi realizada nas

seguintes condições: massa da amostra de aproximadamente 10,0 mg, razão de aquecimento igual a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, de 30 ° a 250°C .

4.6.9. ANÁLISE DA MICROESTRUTURA

As amostras do pós foram observadas por microscopia óptica. O microscópio óptico composto permite ampliações de 1000x e uma resolução de $0,2\text{ }\mu\text{m}$ (TRINDADE, 2007). O microscópio óptico utilizado é da marca NIKON (Figura 7), onde foi acoplada uma máquina fotográfica MPEGMovie, Digital still câmera DSC-550, Cyber-shot com 7 Mega Pixels.

Figura 7- Microscópio óptico- NIKON.



Fonte: A autora

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Abaixo serão apresentados e discutidos os principais resultados obtidos no desenvolvimento desse trabalho. Inicialmente, destacam-se os resultados da caracterização físico-química do soro de leite '*in natura*', o estudo quanto à concentração de suplementação de glicose no meio para o crescimento celular de *L. casei* e a análise da cinética de crescimento. Em seguida, são apresentados os resultados da otimização da secagem do micro-organismo por *spray drying* utilizando o planejamento experimental e, por fim, a caracterização do pó obtido.

5.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SORO DE LEITE E DEFINIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NO MEIO DE CULTURA

Os resultados da caracterização centesimal do soro '*in natura*' estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7- Resultados da Composição Centesimal do Soro de Leite.
dp¹ – desvio padrão

Componente	Concentração média $\pm$ dp ¹ (%)
Proteínas	0,61 $\pm$ 0,03
Lipídios	0,50 $\pm$ 0,00
Umidade	94,31 $\pm$ 0,02
Cinzas	0,56 $\pm$ 0,04
Carboidratos	4,02 (por diferença)

O soro utilizado no experimento é proveniente da preparação do queijo tipo ricota, que segundo ROBINSON (1986), produz um soro que varia de uma acidez média a um soro ácido. A análise da acidez titulável do soro, através do cálculo do grau *Dornic*, apresentou um grau médio de 33° e um pH de 4,0.

De acordo com FITZSIMONS et al. (2006), o soro de leite contém, em média, 93% de água, 5% de lactose, 0,9 a 0,7% de proteínas, 0,5 a 0,3% de gordura, 0,2% de ácido lático e pequenas quantidades de vitaminas. Dessa forma, os valores de composição centesimal encontrados neste estudo estão próximos dos encontrados na literatura. A composição e o tipo de soro de leite produzido industrialmente

dependem do tipo de queijo fabricado e da tecnologia de processamento empregada na produção (SILVEIRA ; ABREU, 2003).

Com a caracterização do soro de leite, foram então testadas diferentes concentrações de glicose para a suplementação de carboidratos ao meio com o objetivo de ser obtida a maior produção de células viáveis com a menor adição de glicose, visando à diminuição de custos do processo fermentativo.

A Tabela 8 mostra os valores de concentração de células viáveis nas amostras de caldo fermentado após 20 h de cultivo de *L. casei* em meio à base de soro de leite, suplementado com diferentes concentrações de glicose.

Tabela 8- Concentração de células viáveis de *L. casei* após 20 horas de fermentação em meio à base de soro de leite suplementado com diferentes concentrações de glicose.

Concentração de glicose (g/L)	Concentração de células viáveis (UFC/mL)
0	$3,08 \times 10^5$
5	$7,25 \times 10^6$
10	$1,24 \times 10^8$
20	$7,48 \times 10^8$
30	$2,75 \times 10^8$
40	$1,68 \times 10^8$

Como podemos observar, a partir da adição de 10 g/L de glicose foi atingida uma concentração celular de ordem de 10^8 UFC/mL, sendo que a maior concentração celular obtida foi de $7,48 \times 10^8$ UFC/mL para 20 g/L de glicose. Bactérias pertencentes ao grupo *Lactobacillus* apresentam complexas exigências nutricionais, sendo necessária a presença de carboidratos, aminoácidos, peptídeos, ésteres de ácidos graxos, sais, vitaminas e derivados de ácidos nucléicos no meio de cultivo (LEITE, 2006). Dessa forma, podemos concluir que o meio de cultivo à base de soro de leite suplementado com 20 g/L de glicose proposto neste trabalho oferece os nutrientes requeridos para a produção de células viáveis de *L. casei* em uma concentração adequada para o uso do caldo fermentado como inoculante em alimentos com características probióticas (BRASIL, 2008).

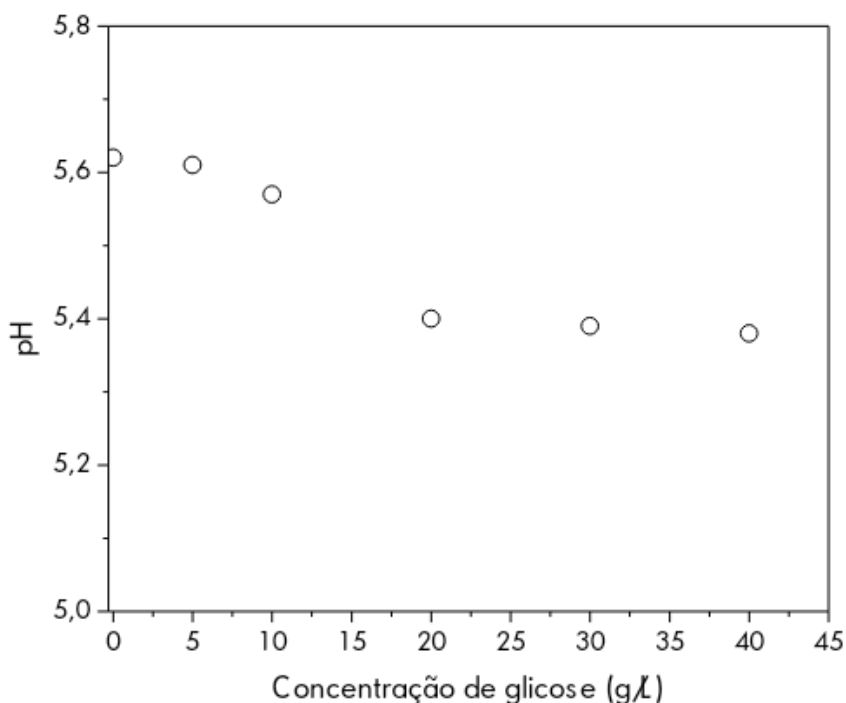
A composição do meio de cultivo utilizado favoreceu a obtenção de uma concentração elevada de células viáveis inclusive pela presença do componente

citrato de sódio. Carmo (2006) relatou que a adição de 0,10 % deste composto já é uma quantidade suficiente para estabilização das proteínas em suspensão.

Barbosa (2011) obteve uma concentração celular da ordem de 10^6 UFC/mL de *Lactobacillus* a partir de vinhoto de cana-de-açúcar suplementado com diferentes fontes de carbono, valor inferior ao atingido em nosso estudo.

No preparo do meio de cultivo, o pH inicial foi ajustado para 6,5, pois as bactérias ácido lácticas crescem bem em pH inicial neutro ou próximo da neutralidade. Os valores de pH ao término do cultivo de 20 horas (Figura 8) mostraram uma leve tendência à acidificação quando é empregada uma concentração de glicose até 20 g/L, o que pode ser justificado por uma maior produção de ácidos com o aumento da concentração deste açúcar. Para valores de glicose acima de 20 g/L, o pH final mantém-se em torno de 5,4.

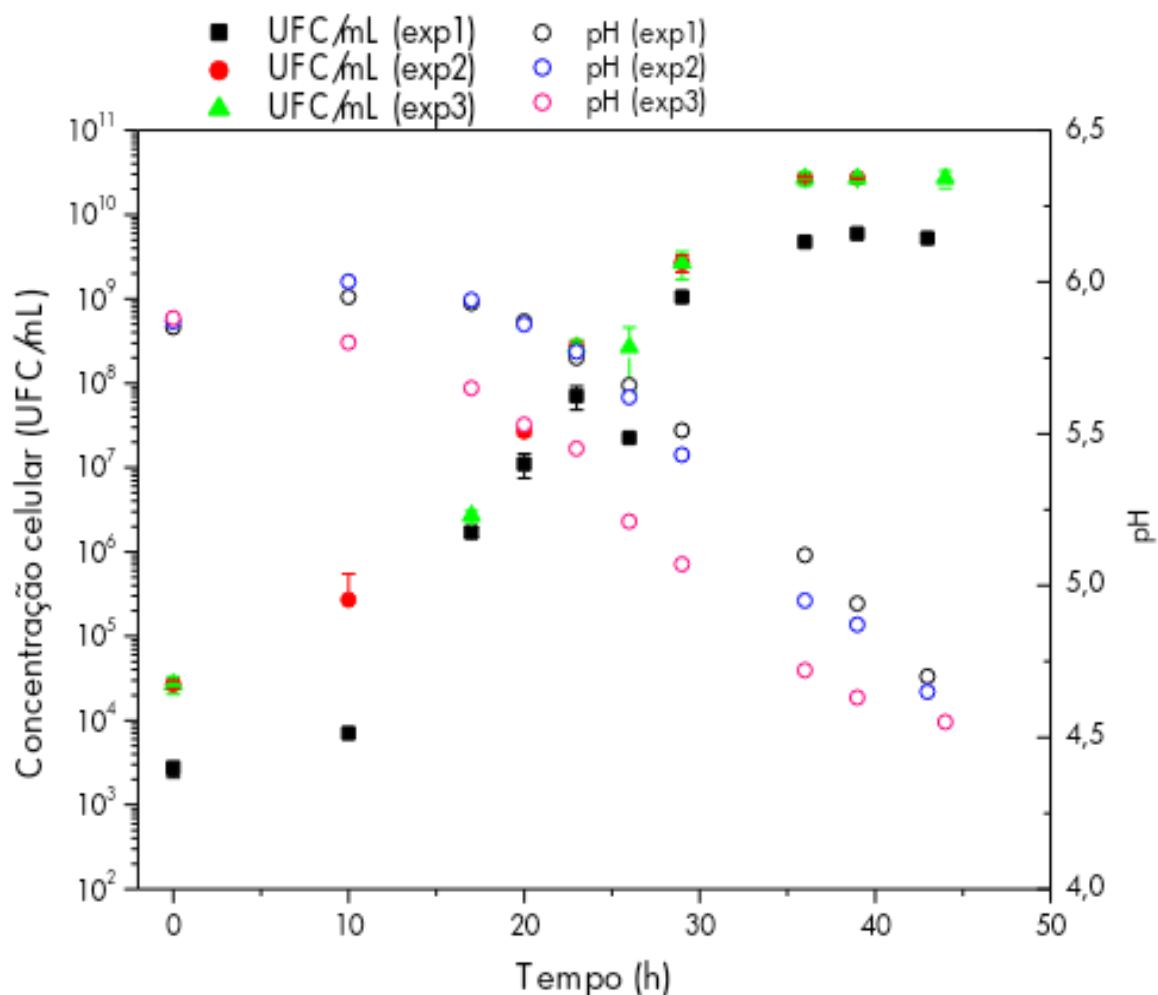
Figura 8- Valores finais de pH após 20 horas de fermentação de *L. casei* em meio à base de soro de leite suplementado com diferentes concentrações de glicose.



5.2. CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR

Com a escolha da concentração de glicose de 20 g/L, foi realizada a cinética de crescimento celular. Os resultados experimentais das concentrações celulares em função do tempo de fermentação, assim como os valores de pH, foram utilizados para confecção do padrão cinético de crescimento demonstrado na Figura 9. Os dados estão apresentados em triplicata.

Figura 9-Concentração de células viáveis e variação do pH durante o cultivo de *L. casei* em meio à base de soro de leite suplementado com 20 g/L de glicose (dados relativos aos experimentos em triplicata).



A cinética de um processo fermentativo constitui uma etapa fundamental para o entendimento da evolução dos valores de uma ou mais variáveis de estudo em função do tempo de fermentação. Podemos identificar na Figura acima que *L. casei* apresentou uma fase de crescimento linear de 10 horas e crescimento exponencial a partir de 17 h de cultivo, atingindo uma velocidade máxima de crescimento (μ_{Max}) de

$0,52 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$. Tais resultados corroboram com Rosa (2010), quando investigou o cultivo de *Lactobacillus* em frascos de penicilina empregando o soro de queijo 'in natura'.

A fase estacionária iniciou-se a partir de 36 h, o que corrobora com os dados apresentados por Panesar (2010), utilizando *L. casei* em meio à base de soro de leite. Ao final de 43 h é atingida uma concentração de células viáveis de 10^{10} UFC/mL, quantidade adequada para o uso do caldo fermentado como probiótico.

As células obtidas a partir da fase estacionária são significativamente mais resistentes ao processo de secagem do que as células em fase exponencial. O aumento da resistência na fase estacionária pode ser justificado em termos de fisiologia, como a quantidade reduzida de DNA replicante (MIRHABIBOLLAHAI, 1988).

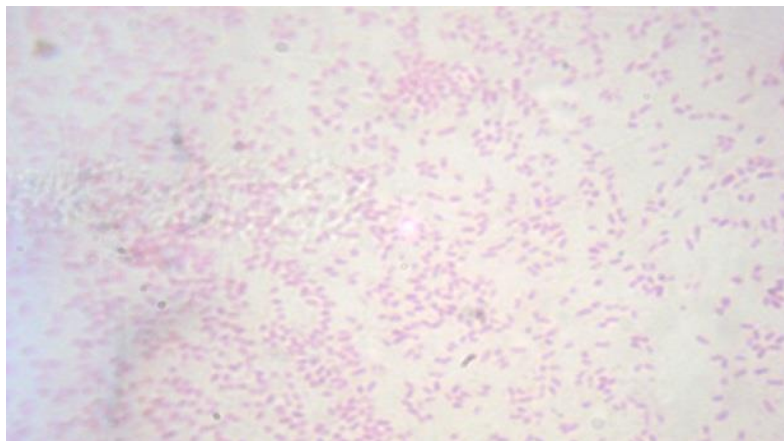
Brinques (2009) obteve uma concentração de células viáveis de *L. casei* da ordem de 10^9 UFC/mL, utilizando meio contendo 25 g/L de soro de leite suplementado com 10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona. Como era importante otimizar as condições de fermentação de produção de células em menor tempo de operação, sem comprometer os resultados de crescimento celular, preconizou-se um tempo total de fermentação de 46 h.

Rosa (2010), trabalhando com a otimização de um meio à base de soro de leite e com diferentes condições de cultivo através de planejamento experimental, mostrou que um tempo maior de fermentação não causa diferença significativa no crescimento celular, podendo inclusive comprometer a fermentação.

O pH decresceu de 6,0 a 4,5, indicando a acidificação do meio pelos produtos da fermentação. Segundo Monteiro (1999), o pH que restringiria o crescimento do micro-organismo *L. delbrueckii* fixa-se em 3,5, contudo não sendo ainda letal a este.

A microscopia a fresco dos caldos e a coloração pela técnica de Gram (Figura 10) apresentaram culturas características de células de *L. casei*, não evidenciando dessa forma contaminantes. A inoculação em meio MRS Ágar também indicou a pureza dos caldos fermentados.

Figura 10- *L.casei* - técnica de Gram (aumento de 1000x).



Fonte: A autora

A medida de SST permitiu determinar o percentual, em peso, de sólidos totais (proteínas, açúcares e minerais) dissolvidos no caldo fermentado (HAMERSKI, 2009). O resultado obtido foi de um °Brix igual a 14.

Os resultados demonstraram que o soro de leite é um subproduto com potencial a ser utilizado no cultivo de *L. casei*, permitindo uma elevada produção de células e sendo uma opção de baixo custo quando comparado aos meios sintéticos.

5.3. OTIMIZAÇÃO DA SECAGEM DE *L. CASEI* POR SPRAY DRYING

Inicialmente foram realizados testes preliminares de secagem para determinação das faixas de temperatura do ar de entrada e escolha do adjuvante de secagem. A caracterização do produto obtido após a secagem foi realizada através da contagem de células viáveis, sendo observados ainda o aspecto macroscópico do pó formado e a aderência à parede do equipamento.

O agente encapsulante que demonstrou maior solubilidade foi a maltodextrina, diferentemente do Tween 80, que necessitou de vigorosa agitação para sua total homogeneização. Os testes realizados com soro de leite '*in natura*', amido de milho, pectina e fosfatidilcolina conferiram ao pó formado as maiores aderências às paredes do equipamento. Isto dificulta a aplicação destes como agentes encapsulantes do presente estudo, já que esta aderência aumenta o tempo de residência do pó ao ciclone, influenciando a taxa de sobrevivência dos micro-organismos (LIEVENSE; VAN'T RIET, 1993). A aderência do pó ao ciclone com o

soro de leite '*in natura*' como agente encapsulante é resultado da facilidade que os produtos lácteos desidratados tem de absorver água, tornando-se mais susceptíveis a modificações químicas e bioquímicas, como por exemplo, a reação de Maillard (PERRONE, 2010).

Com base nas observações mencionadas acima, foi selecionado como agente encapsulante do presente estudo a maltodextrina. Esta, por sua vez, é um produto de relativo baixo custo, contribuindo dessa forma para uma diminuição no custo do processo de secagem.

A maltodextrina é um produto estável, de baixa higroscopicidade, sendo usada para manter baixo o nível de umidade em produtos em pó. É um dos agentes encapsulantes mais utilizados nos processos de microencapsulação, apresentando efeito antioxidante e preservando o produto (SHAHIDI; HAN, 1993). Coutinho (2010) relata que as maltodextrinas possuem uma ampla aplicação nas indústrias de alimentos e na encapsulação por serem solúveis em água.

Definidas as faixas de temperatura do ar de entrada, foi empregada a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) por meio de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para se compreender a influência das variáveis temperatura de entrada do ar e concentração de maltodextrina sobre a concentração de células viáveis dos pós formados.

O caldo fermentado utilizado na produção do probiótico em pó foi seco sem qualquer tratamento adicional, visando baratear o processo de secagem. Preocupou-se apenas na escolha da fase do processo fermentativo. Células em fase estacionária são significativamente mais resistentes se comparadas às células em fase exponencial. O aumento da resistência das células na fase estacionária pode ser justificada pela quantidade reduzida de DNA replicante nessa fase (MIRHABIBOLLAHAI, 1988). A desnaturação do DNA é a causa mais comum de morte celular em secagem, onde são aplicadas temperaturas acima de 90 °C (TEIXEIRA et al., 1997).

As Figuras 11A e 11B mostram a superfície de resposta e a curva de contorno para a variável concentração de células viáveis no primeiro planejamento experimental realizado.

A maior concentração de células viáveis ($1,5 \times 10^8$ UFC/g) foi obtida para as condições de secagem de 95 °C e 20 % de maltodextrina. Por outro lado, para a

mesma temperatura e uma concentração de adjuvante de apenas 1 % a viabilidade celular foi nula.

Os resultados indicam que a faixa ótima para maximizar a concentração de células viáveis abrange toda a faixa de temperatura investigada e valores de concentração de maltodextrina acima de 18% (m/v). De acordo com LESLIE et al. (1995) e CASTRO et al. (1997), a incorporação de açúcares aumenta a sobrevivência das bactérias durante a secagem. Magalhães Netto (1997) afirma ainda que a presença de carboidratos de peso molecular mais alto, como a maltodextrina, contribui para auxiliar na estabilidade do sistema.

Nos ensaios 1 (77,3 °C e 3,8 % de maltodextrina) e 2 (112,7 °C e 3,8 % de maltodextrina) foi observada uma aderência do pó nas paredes da câmara de secagem e, conseqüentemente, perdas do material encapsulado. A aderência observada poderá estar relacionada à mudança de estado físico, pois segundo Magalhães Netto (1997), estruturas amorfas ou parcialmente amorfas são formadas em vários processos como a desidratação (*spray-drying*). A remoção da água durante a secagem produz esse tipo de estrutura.

A análise de variância aplicada aos resultados da matriz do planejamento é mostrada no gráfico de Pareto (Figura 12). Este gráfico é uma das formas de se avaliar visualmente a influência dos fatores estudados sobre a variável resposta. A magnitude dos efeitos é representada pelas colunas, enquanto que a linha transversa às colunas representa a magnitude dos efeitos com significado estatístico para $p = 0,05$, ou seja, valores estatísticos com 95% de confiança.

Observa-se que a concentração de adjuvante foi a variável que influenciou de forma mais significativa a variável resposta, atingindo efeitos estimados positivos de 34,9 e 30,4. A maltodextrina confere melhor resistência ao material em secagem com temperaturas elevadas (ANEKELLA, 2011), exercendo um efeito protetor às células.

Figura 11-Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a concentração de células viáveis de *L. casei* em função da temperatura de entrada do ar e da concentração de maltodextrina para o primeiro planejamento experimental.

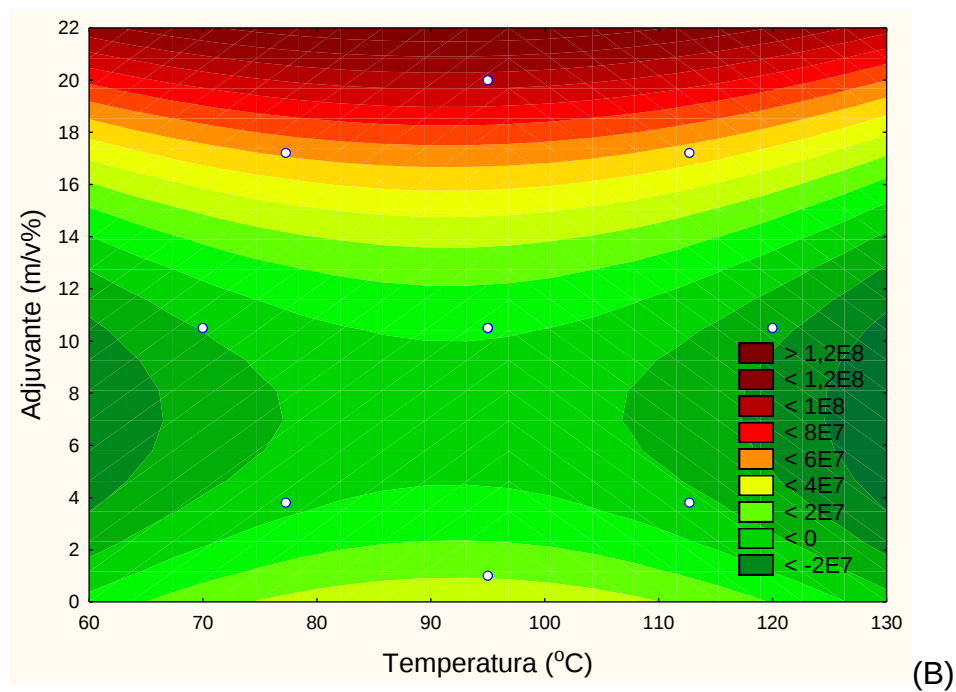
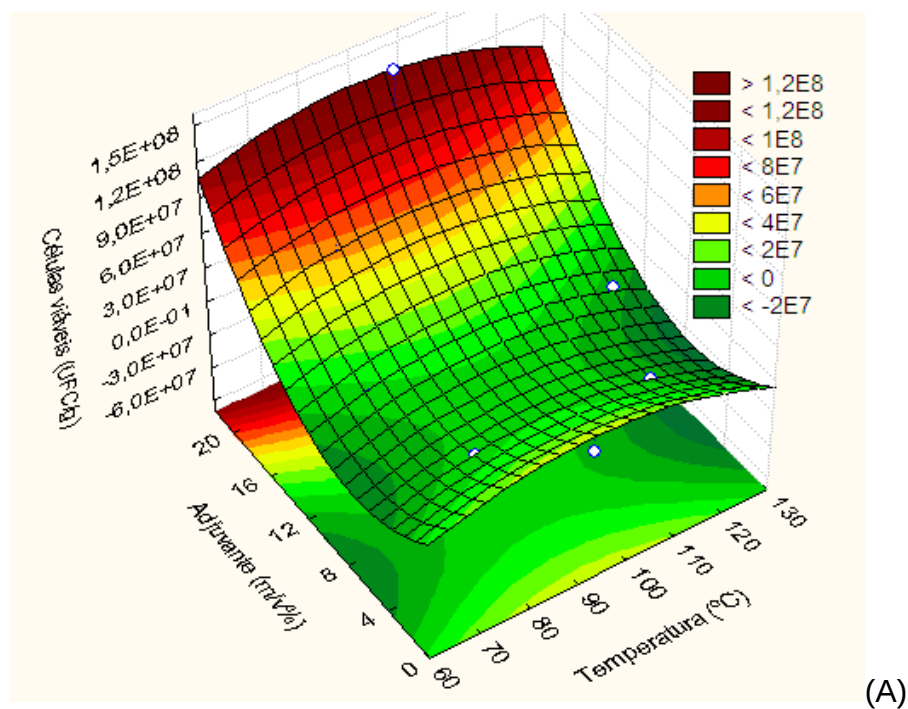
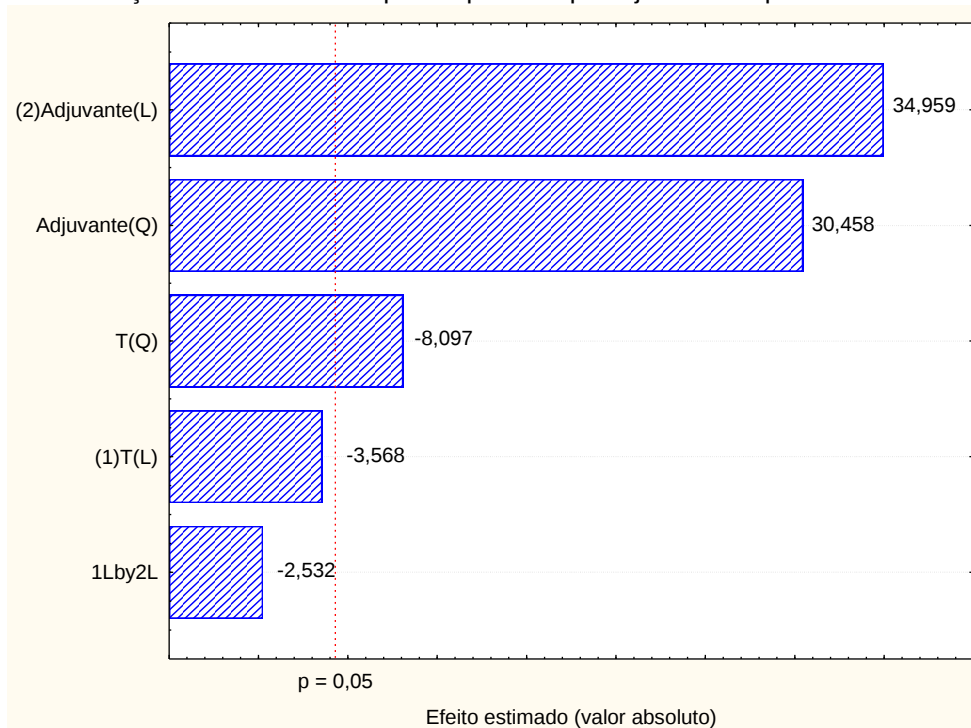


Figura 12-Diagrama de Pareto para a concentração de células viáveis de *L. casei* em função da temperatura de entrada do ar e da concentração de maltodextrina para o primeiro planejamento experimental.



Com relação à temperatura, o termo quadrático apresenta significância estatística, exercendo um efeito estimado negativo (-8,0). Este resultado indica que pode ser atingida uma maior viabilidade celular para faixas menores de temperatura.

A Tabela 9 mostra os valores obtidos para a atividade de água (A_w) nos experimentos do primeiro planejamento experimental. Em todos os ensaios os valores de A_w permaneceram abaixo de 0,3, o que, de acordo com Tonon et al. (2009), melhora a estabilidade do pó pois representa menos água livre disponível para as reações bioquímicas. Nota-se que no ensaio de temperatura mais elevada foi observado o menor valor de A_w , sugerindo que a utilização de maiores temperaturas para o ar de entrada reduz o teor de água livre no produto.

Como neste planejamento a condição máxima de concentração de células viáveis não foi atingida, um novo planejamento experimental foi realizado para menores valores de temperatura (50 a 70 °C) e concentração de maltodextrina entre 5 e 25 % (m/v). Neste caso, a A_w foi determinada apenas na condição selecionada de secagem do micro-organismo.

Tabela 9- Resultados de atividade de água (A_w) dos pós de *L. casei* obtidos nos experimentos do primeiro planejamento experimental.

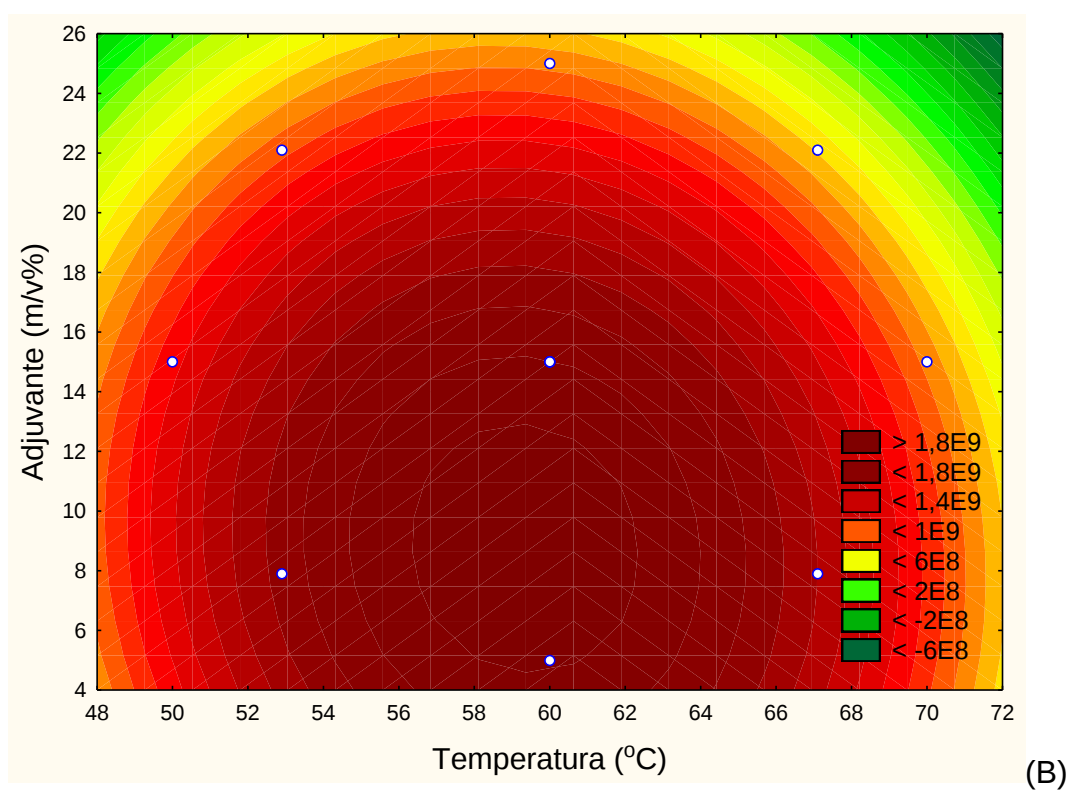
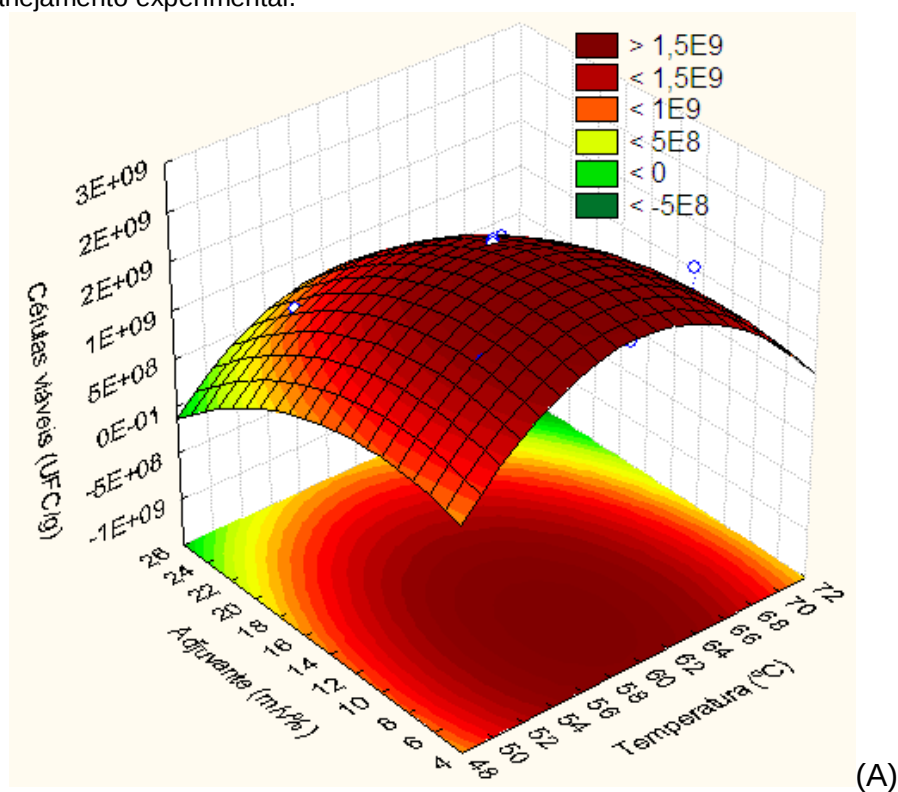
TEMPERATURA DE ENTRADA (°C)	CONCENTRAÇÃO DO ADJUVANTE (m/v%)	A_w
-1 (77,3)	-1 (3,8)	0,15
+1 (112,7)	-1 (3,8)	0,13
-1 (77,3)	+1 (17,2)	0,13
+1 (112,7)	+1 (17,2)	0,14
-1,41 (70)	0 (10,5)	0,14
+1,41 (120)	0 (10,5)	0,05
0 (95)	-1,41 (1)	0,15
0 (95)	+1,41 (20)	0,23
0 (95)	0 (10,5)	0,14
0 (95)	0 (10,5)	0,13
0 (95)	0 (10,5)	0,13

A Figura 13A mostra a superfície de resposta e a Figura 13B ilustra a curva de contorno para a variável concentração de células viáveis no segundo planejamento experimental.

Como podemos observar, a região ótima para a concentração de células viáveis foi atingida. Maiores concentrações de células são obtidas para temperaturas mais amenas em relação ao primeiro planejamento experimental.

A temperatura do ar de entrada influencia diretamente a temperatura do ar de saída, sendo esta variável um parâmetro crítico que afeta a sobrevivência dos micro-organismos (TEIXEIRA et al., 1995; GOLOWCZYC et al., 2010). Os dados experimentais mostraram que a diferença entre as duas temperaturas (saída e entrada) fica em torno de 20 ± 5 °C. Vale salientar que a temperatura de saída do secador é de difícil predição, controle ou correção para qualquer

Figura 13- Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a concentração de células viáveis de *L. casei* em função da temperatura de entrada do ar e da concentração de maltodextrina para o segundo planejamento experimental.

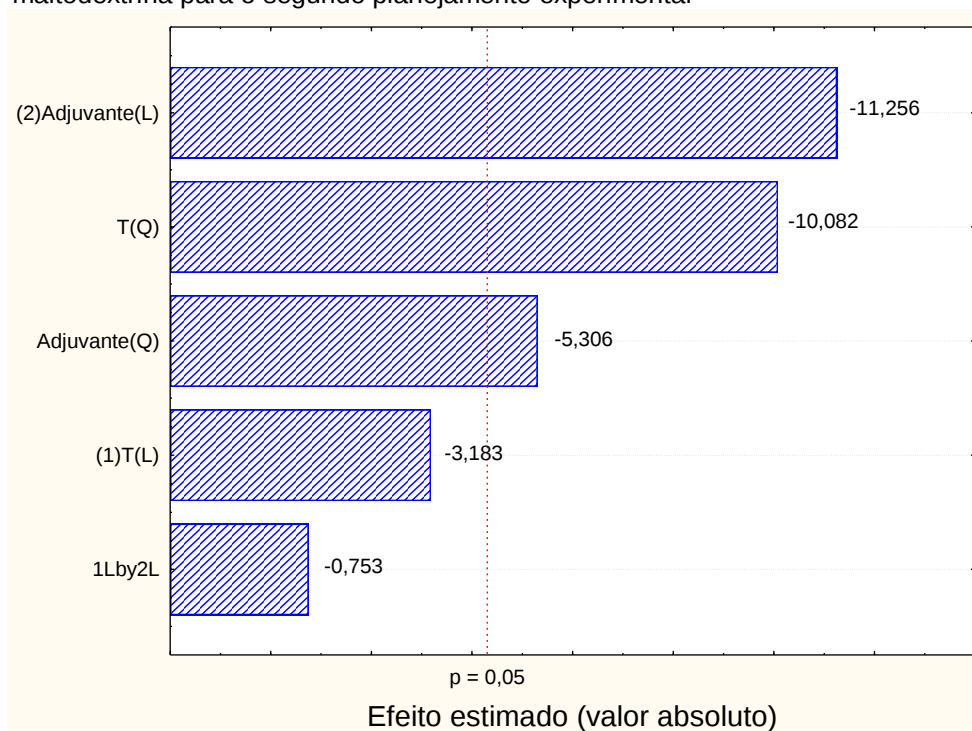


dado conjunto de condições de operação, já que depende, além da temperatura do ar de entrada, das características das soluções atomizadas. O efeito da temperatura sobre a sobrevivência dos probióticos é também dependente da estirpe (SILVA et al., 2002). Em recentes estudos foi observado o efeito deletério na viabilidade da cultura com o aumento da temperatura de saída (GARDINER et al., 2000).

Gardiner et al. (2000), em estudos sobre a sobrevivência *L. paracasei* NFBC 338 em secagem por spray e utilizando uma temperatura de saída de 70 °C, obtiveram um rendimento máximo de 97% na concentração de células viáveis. Por outro lado, a aplicação de uma temperatura de saída de 120 °C resultou em uma taxa nula de sobrevivência.

Pela análise estatística dos resultados obtivemos o gráfico de Pareto (Figura 14), onde os termos linear e quadrático da concentração de maltodextrina, bem como o termo quadrático da temperatura apresentaram-se significativos ($p < 0,05$). Em todos os casos, os efeitos estimados negativos

Figura 14- Diagrama de Pareto para a concentração de células viáveis de *L. casei* em função da temperatura de entrada do ar e da concentração de maltodextrina para o segundo planejamento experimental



demonstram que quanto menores os valores de temperatura e concentração de adjuvante, maior a concentração de células viáveis.

Os valores críticos do modelo que maximizam a resposta foram equivalentes a uma concentração de maltodextrina de 8,75 % (m/v) e temperatura de 59,3 °C, predizendo um valor máximo teórico para a concentração de células viáveis de $1,97 \times 10^9$ UFC/g.

Um ensaio em triplicata foi realizado nessas condições para confirmação desse resultado. No entanto, pudemos observar que a característica macroscópica do produto formado não foi satisfatória, como pode ser notado na Figura 15. O produto era nitidamente higroscópico, apresentando tendência à aglomeração e ficando aderido às paredes do *spray*. Sugere-se que tal resultado pode ter ocorrido dada a baixa concentração de maltodextrina.

Figura 15 - Aspecto macroscópico do produto formado utilizando uma concentração de maltodextrina de 8,75 % (m/v) e temperatura de 59,3 °C.



Fonte: A autora

A qualidade final do produto obtido por secagem em *spray drying* é afetada positivamente pela concentração do adjuvante de secagem, o que podemos evidenciar no nosso estudo, onde o aumento na proporção do adjuvante favorece as características macroscópicas do pó. A diminuição na concentração de maltodextrina resulta, portanto, em pós mais higroscópicos. Isso se deve ao fato de a maltodextrina ser um material de baixa higroscopicidade, reduzindo assim a

higroscopicidade de produtos desidratados em *spray dryer*, o que confirma a sua eficiência como agente encapsulante.

Tonon et al. (2009) e Rodríguez-Hernández et al. (2005) observaram que os pós menos higroscópicos foram aqueles obtidos com as maiores concentrações de maltodextrina. Um teor alto de higroscopicidade não afeta apenas o rendimento do processo (já que dificulta a coleta do material), mas também compromete a estabilidade microbiológica do produto final.

A perda de material aderido às paredes do *spray drying* está relacionada ao fenômeno de transição vítrea. A temperatura de transição vítrea (T_g), assim como a alta higroscopicidade de produtos em pó amorfos estão relacionados ao problema de *stickness* (RODRIGO, 2012). Wirjantoro e Phianmongkhon (2009) relataram em seus estudos que uma temperatura do ar de saída inferior a 60 °C não seria eficaz para produzir um pó seco, e que temperaturas de saída acima de 90 °C iriam produzir um pó de menor qualidade. Contudo, em nossos estudos, temperaturas mais amenas garantiram sim uma qualidade ao produto final. Yang (2010) relata que variações nos resultados entre os estudos, mesmo quando os mesmos parâmetros de secagem são aplicados, justificam-se pelo uso de diferentes cepas e diferentes matrizes encapsulantes.

Diante deste resultado, realizou-se uma secagem no ponto extremo do planejamento (temperatura de 70 °C e 25 % de maltodextrina), visando determinar se nesta condição de secagem seria obtido um pó com concentração de células viáveis e características macroscópicas adequadas. O aspecto macroscópico do produto obtido pode ser visualizado na Figura 16.

Figura 16- Aspecto macroscópico do produto formado utilizando uma concentração de maltodextrina de 25 % (m/v) e temperatura de 70 °C.



Fonte: A autora

O pó obtido se apresentou na forma de um granulado fino e de fácil coleta das paredes do ciclone e do vaso coletor, com uma concentração de células viáveis de $1,12 \times 10^{10}$ UFC/g. Diante desses resultados positivos, foi escolhida esta condição de secagem para a obtenção do produto probiótico em pó.

A alta concentração de células viáveis apresentadas no presente estudo pode ser justificada pela incorporação em maior quantidade da maltodextrina, assim como a diminuição da temperatura do ar de entrada, o que conseqüentemente acarretou na diminuição da temperatura do ar de saída.

O estresse ocasionado pelos processos térmicos afeta diretamente as funções enzimáticas, necessárias para manutenção da viabilidade (YANG et al., 2012). Além disso, a utilização de temperaturas elevadas pode formar poros nas membranas, fazendo com que substâncias intracelulares vazem (CORCORAN et al., 2004; GARDINER et al., 2000.), e que ocorra desnaturação das proteínas (MENG et al., 2008). No entanto, a incorporação de adjuvantes preserva a integridade das membranas celulares.

Ivanovska et al. (2012), quando investigaram a secagem de células de *L. casei* encapsuladas com alginato e frutooligossacarídeos utilizando uma temperatura de entrada de 120 °C e temperatura de saída de 60 °C, obtiveram uma redução de aproximadamente 1 ciclo logarítmico.

Sunn-yroberts e Knorr (2009) relataram que a sobrevivência de *L. rhamnosus* após *spray drying* foi inversamente proporcional à temperatura de saída.

Ying (2012), analisando o efeito da encapsulação de *L. rhamnosus* GG utilizado preparações WPI e maltodextrina (1:2) e WPI, maltodextrina e glicose (1:1:1), observaram uma inativação de aproximadamente 0,5 log₁₀ UFC/g.semana e 0,3 log₁₀ UFC/g.semana, respectivamente.

Segundo Kitamura et al. (2009), durante a secagem de alimentos líquidos, ingredientes funcionais são usualmente degradados em temperaturas acima de 120 °C. Almeida (2012), em estudos de desidratação de suco de abacaxi contendo *L. casei* NRRL B-442 por *spray dryer*, verificou que o uso de temperaturas mais baixas (100 °C) e a aplicação de tratamento térmico no suco favoreciam a sobrevivência do micro-organismo.

Outro fator que pode ter contribuído para a alta concentração de células viáveis obtida no pó após a secagem por *spray dryer* foi o meio de cultura empregado no processo fermentativo, que apresenta grande carga protéica. Proteínas contidas na solução alimentadora criam uma interface entre o núcleo e o ar durante a atomização, ocorrendo a desnaturação protéica e formando uma barreira protetora. Isto resulta no aumento da rigidez da microcápsula, formando uma barreira contra o contato com a água e o oxigênio, que são prejudiciais para a viabilidade dos probióticos (WANG et al., 2010).

Dessa forma, o uso de baixas temperaturas de ar de entrada e, consequentemente, baixas temperaturas de ar de saída, aliadas a maiores concentrações de maltodextrina, favorecem a viabilidade de *L. casei*.

5.4. CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS

A caracterização ao que cerne a rehidratação do pó foi obtida pela medida da solubilidade e molhabilidade. As microcápsulas apresentaram uma solubilidade de 97,03 ± 0,04 %, enquanto que a molhabilidade foi de 100% em apenas 1,16 minutos.

O teste de molhabilidade é largamente utilizado pela indústria (BEDDOW, 1980). É um ensaio simples que fornece um parâmetro do tempo necessário para que o produto em pó seja absorvido pelo líquido. O teste efetuado demonstrou que o probiótico em pó possui reduzido tempo de molhabilidade. O tempo máximo para o

produto molhar é uma escolha arbitrária, porém se 90% do produto mergulhar no líquido em 5 minutos, já se considera um bom resultado. Dessa forma, observa-se que o pó obtido neste trabalho está bem abaixo deste limite.

Este resultado pode ser justificado pela baixa temperatura utilizada para formação do pó, já que com a aplicação de altas temperaturas de secagem é formada uma rígida camada na superfície da microcápsula, impedindo a difusividade das moléculas de água através destas e reduzindo assim a dissolução do pó (CHEGENI; GHOBADIAN, 2005).

Outro parâmetro importante na caracterização de um produto em pó refere-se a sua atividade de água. Esta afeta a capacidade de processamento, propriedades de manuseamento e estabilidade do pó (ROSS, 2002). O pó obtido no presente estudo apresentou uma atividade de água de $0,14 \pm 0,0$.

Santivarangkna et al. (2008) concluíram que, a fim de manter a viabilidade dos pós probióticos, a atividade de água deveria ser mantida a menor possível, enquanto que Yang (2010) mostrou que a viabilidade celular diminui com o aumento da A_w . Uma taxa de A_w alta ocasiona um aumento da mortalidade dos micro-organismos probióticos durante o armazenamento, uma vez que propicia o crescimento de outros micro-organismos, assim como reações químicas indesejáveis (CHÁVEZ; LEDEBOER, 2007; WANG et al., 2004; YING et al., 2010).

A baixa mobilidade molecular da água contribui para a estabilização de sistemas biológicos durante o armazenamento a longo prazo (BUITINK et al., 2000). A atividade de água e presença de oxigênio são fatores que afetam a viabilidade dos probióticos durante o armazenamento (ANAL; SINGH, 2007; WEINBRECK et al., 2010).

Foi relatado que uma A_w menor que 0,3 (teor de umidade inferior a 5 %) é essencial para uma boa sobrevivência dos probióticos durante o armazenamento (CHÁVEZ; LEDEBOER, 2007). De acordo com KOC et al. (2010) e KUMAR; MISHRA (2004), a A_w deve estar entre 0,11-0,23 para a maioria das espécies de *Lactobacillus*. Portanto, o valor de A_w observado no presente estudo encontra-se adequado para um pó probiótico de *L. casei*.

Em relação à higroscopicidade, foi obtido um valor de 35,20 g H_2O /100g. Tonon et al. (2009), avaliando o processo de secagem por *spray drying* utilizando uma temperatura do ar de entrada de 138 °C e uma concentração de maltodextrina de 20 %, obtiveram valores de higroscopicidade abaixo de 16 g H_2O /100g. Cai e

Corke (2000) observaram em seus estudos que a maltodextrina resultou em uma diminuição de 50 % de higroscopicidade da betacianina em relação à amostra sem a adição deste agente. A temperatura de secagem tem efeito significativo sobre as propriedades finais do pó, onde a redução da temperatura leva a obtenção de partículas menos higroscópicas (Tonon et al., 2008).

Um fator que está intimamente relacionado à higroscopicidade é a umidade. Partículas com baixo teor de umidade possuem alta higroscopicidade devido a sua grande capacidade de absorver umidade do ambiente, o que está relacionado com o gradiente de pressão de vapor entre as microcápsulas e o ar ambiente. No presente estudo, as microcápsulas apresentaram umidade de $4,80 \pm 0,43$ %.

Segundo GARDINER et al. (2000) e MENG et al. (2008), é necessária uma umidade residual de 4 % ou menos para o armazenamento prolongado de pós contendo probióticos (ZAYED; ROOS, 2004). A oxidação dos ácidos graxos das membranas de células bacterianas é acelerada pelo aumento da umidade relativa, e a combinação de agentes encapsulantes é uma estratégia eficaz para a preservação dos micro-organismos probióticos (CASTRO et al., 1995).

Um aumento na umidade relativa do ar pode levar ainda a problemas de aglomeração (ANEKELLA, 2011). Em estudo da secagem de duas estirpes de *L. kefir*, foi demonstrado que a sobrevivência bacteriana foi significativamente maior sob condições de baixa umidade (GOLOWCZYC et al., 2010).

5.4.1. ANÁLISE TÉRMICA DAS MICROCÁPSULAS

Análise térmica é um termo que abrange um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física ou química de uma substância, ou de seus produtos de reação, é monitorada em função do tempo ou temperatura. São utilizadas para caracterizar a decomposição e estabilidade térmica dos materiais, bem como para examinar as cinéticas dos processos físico-químicos que ocorram na amostra.

Dentre as técnicas empregadas temos a TGA (Análise Termogravimétrica), DTA (Análise Térmica Diferencial) e DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial). As Figuras 17A e 17B mostram os resultados das análises de TGA, DTA e DSC para as amostras das microcápsulas e da maltodextrina.

Figura 17- Valores de TGA, DTA e DSC para microcápsulas de *L. casei* (A) e maltodextrina (B) (secagem de microcápsulas de *L. casei* por *spray drying* a 70 °C e concentração de maltodextrina de 25 % (m/v)

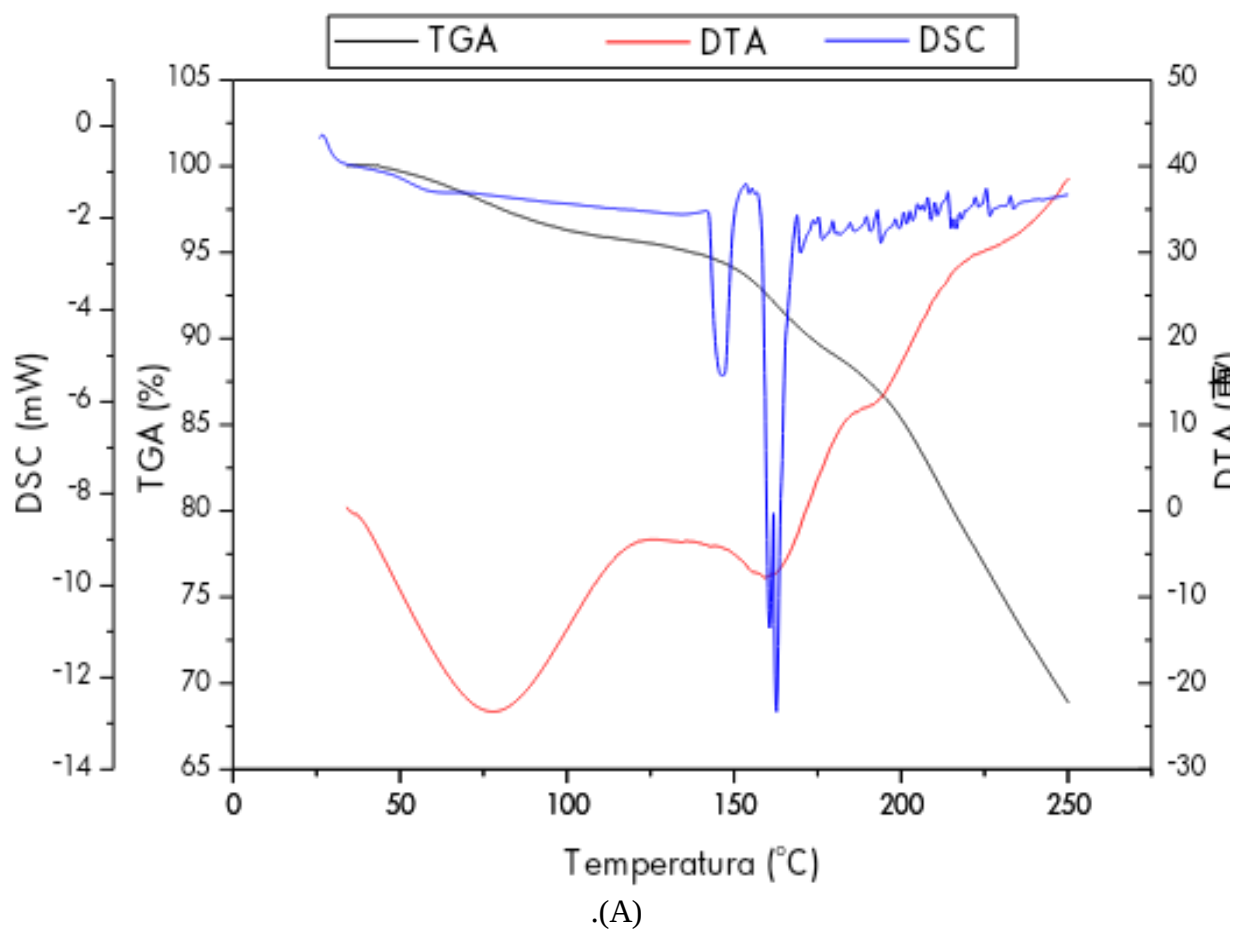
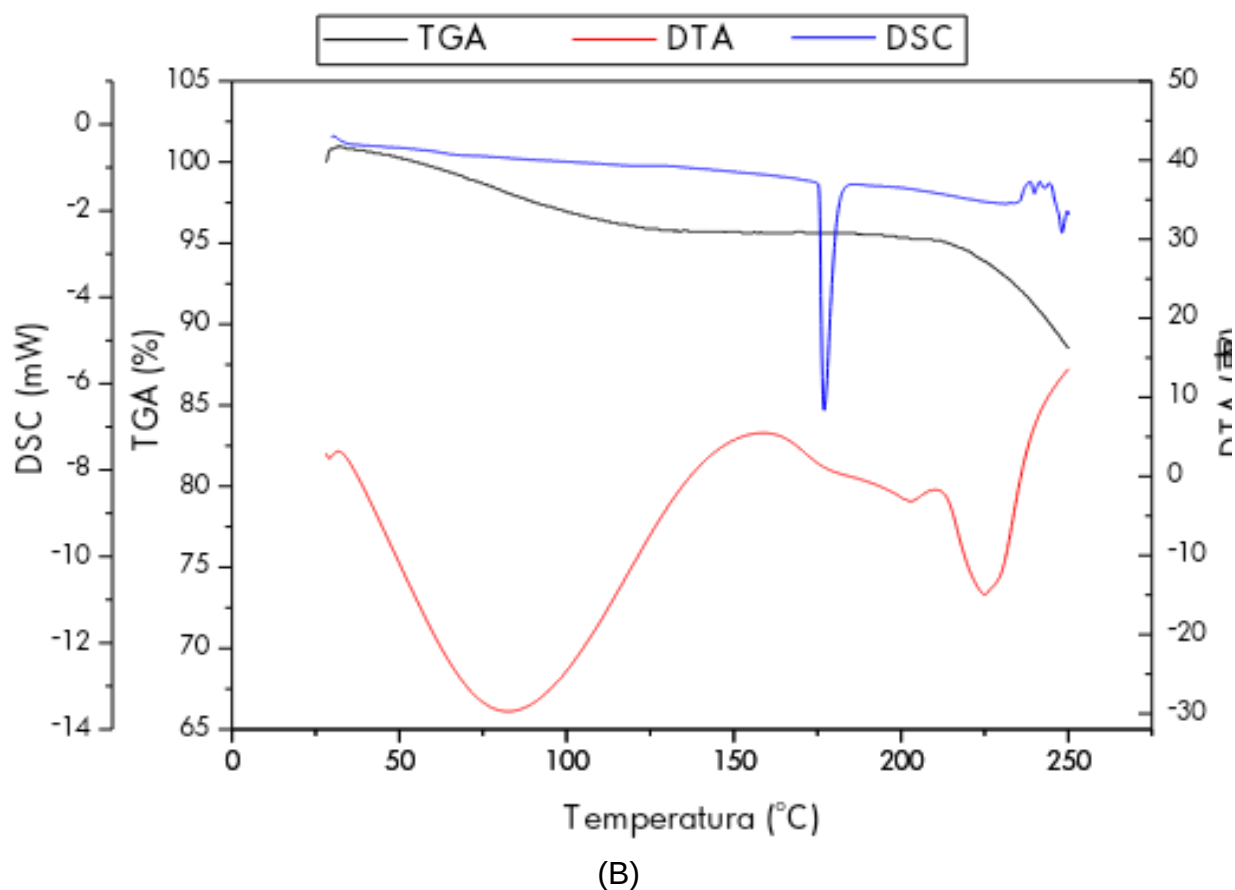


Figura 17- (Continuação) Valores de TGA, DTA e DSC para microcápsulas de *L. casei* (A) e maltodextrina (B) (secagem de microcápsulas de *L. casei* por *spray drying* a 70 °C e concentração de maltodextrina de 25 % (m/v)



Analisando a linha do DTA da amostra das microcápsulas notamos uma reação endotérmica no início do aumento da temperatura, o que representa a perda de água adsorvida na amostra das microcápsulas. O mesmo perfil pode ser observado na análise da maltodextrina, porém neste caso a perda de água ocorre em um processo mais acentuado e longo. Este comportamento é previsto, pois a amostra de maltodextrina possivelmente contém mais água não ligada que a amostra das microcápsulas, visto que não passou pelo processo de secagem em *spray*.

A 125 °C a amostra das microcápsulas apresenta uma variação na sua capacidade calorífica, sendo observada mais uma reação de absorção de calor acima de 150 °C. Comparando com a DTA da maltodextrina, vemos que essa possui uma variação da capacidade calorífica em uma temperatura mais alta (em torno dos 160 °C), e outro pico endotérmico apenas após 200 °C. Esta provavelmente é a

temperatura na qual a maltodextrina inicia o processo de formação de produtos carbonáceos (cinzas).

Produtos alimentícios em pó que venham a conter carboidratos amorfos podem passar por mudanças físicas que estão diretamente ligadas à temperatura de transição vítrea (T_g), como em processos de pegajosidade e compactação durante a estocagem (ROOS, 2010). A temperatura de transição vítrea é considerada como uma temperatura de referência, onde abaixo desta o alimento é mais estável. A diferença entre a T_g e a temperatura de estocagem é a responsável pelo controle das taxas de mudanças físico-químicas e biológicas (JULIANO; BARBOSA - CÁNOVAS, 2010). Estudos indicam que a utilização de maltodextrina como agente encapsulante pode aumentar a T_g de microcápsulas de bactérias do gênero *Lactobacillus* (YANG et al., 2012).

A análise de DSC permitiu medir a variação de entalpia das amostras em função da temperatura. O gráfico DSC das microcápsulas apresentou duas transformações de segunda ordem. A Temperatura de Transição Vítrea (T_g) observada foi de 56 °C, sendo percebida no gráfico pela mudança na linha de base. Este resultado é vantajoso em se tratando da amostra do probiótico em pó, já que a amostra teria sua atividade biológica preservada em temperaturas inferiores. Em torno de 40 °C temos uma deflexão inicial dos valores de DSC na amostra das microcápsulas, sendo proporcional a capacidade calorífica desta.

A 140 °C ocorre a transição vítrea da fase amorfa contida nas microcápsulas e fusão da fase cristalina, em dois pontos representados pelas duas quedas consecutivas no gráfico (em azul). Essa diferença encontrada na amostra pode estar relacionada a não homogeneidade dos pós, onde possivelmente há material biológico não microencapsulado. A área do pico endotérmico ocorrido a 140 °C corresponde ao calor de fusão das microcápsulas durante o processo de mudança de fase, o que demonstra que as microcápsulas apresentam boa resistência a altas temperaturas. Acima de 200 °C temos um indicativo do início da degradação oxidativa; contudo, são observadas interferências, sendo estas causadas pelo rompimento dos cadinhos. Isto ocorre porque quando é atingida a temperatura de 200 °C, o material se expande causando falsos picos nos gráficos. Contudo, avaliamos que a 160 °C já é iniciada a decomposição das microcápsulas, resultado que está de acordo com HAINES (1995).

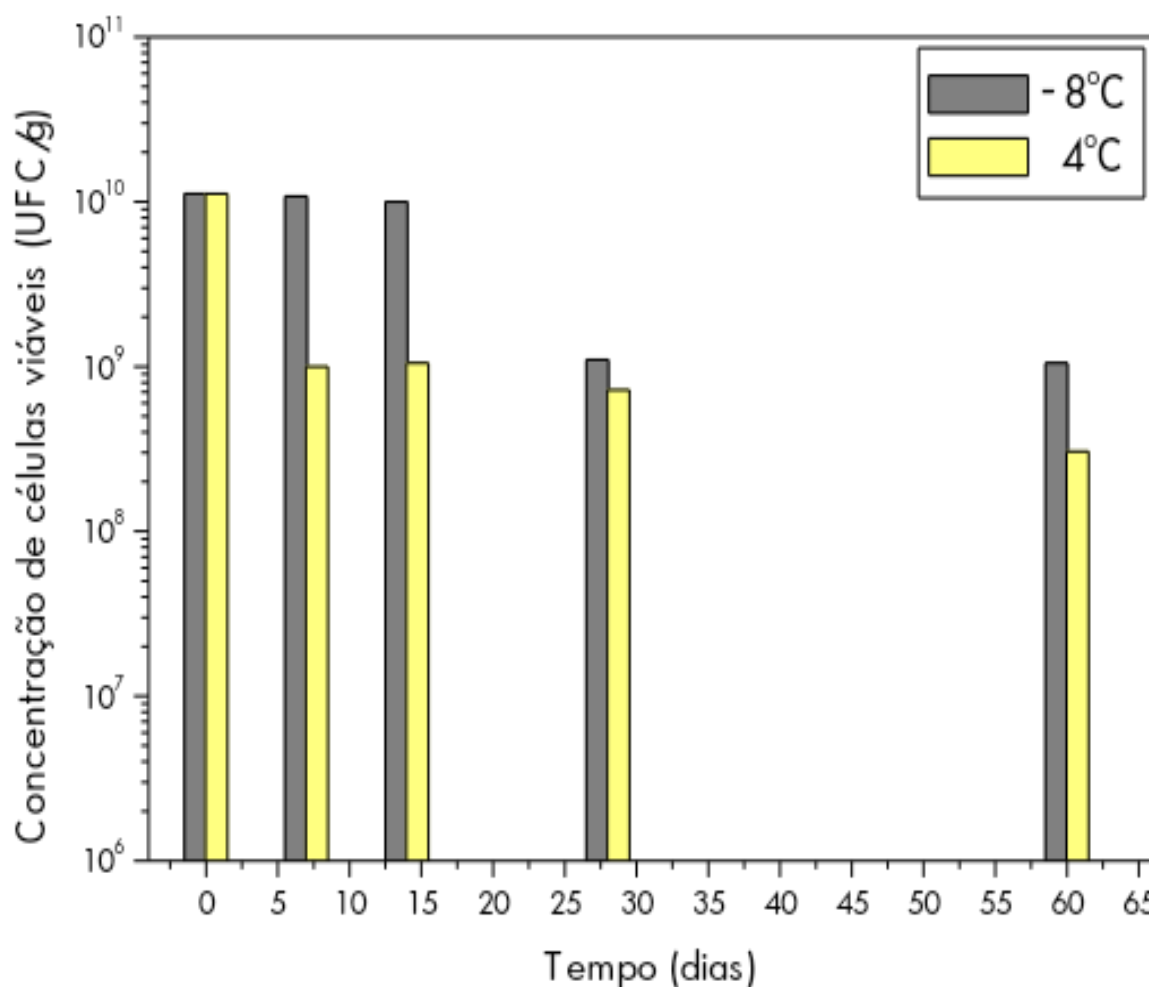
A curva de TGA para a amostra das microcápsulas mostra uma curva típica de perda de massa. O resultado indica que até 160 °C a amostra continha relativo baixo teor de matéria orgânica, sendo que a partir desta temperatura a amostra degradou-se rapidamente durante o aquecimento. Não foi possível caracterizar toda a perda de massa orgânica, já que a partir de 200 °C, como mencionado anteriormente, ocorre o rompimento do cadinho.

O resultado de DSC para a amostra de maltodextrina mostra que ocorre um início de decomposição em torno de 215 °C, o que indica que não houve formação de outro material até esta temperatura. A 175 °C é observado um pico endotérmico, com fusão da fase cristalina da maltodextrina, que é o ponto da mudança de fase. Como visto também nas microcápsulas, a temperaturas acima de 200 °C ocorre o início da decomposição do material. Segundo Elnaggar (2010), após aquecimento de uma amostra de maltodextrina em pó até 220 °C, foi observada uma carbonização sem fusão, o que correlata com a observação de degradação da amostra a partir de 200 °C.

5.4.2. VIDA DE PRATELEIRA- (*SHELF LIFE*)

Foi avaliada a estabilidade dos pós durante um período de estocagem de 60 dias (*shelf life*), sob diferentes condições de temperatura (temperatura ambiente $\pm$ 30 °C; temperatura de – 8°C e 4°C). Todas as análises partiram de uma amostra de contagem inicial de $1,12 \times 10^{10}$ UFC/g. Os resultados estão apresentados na Figura 18.

Figura 18- Avaliação do tempo de armazenamento sobre a viabilidade celular de microcápsulas de *L. casei* por um período de 60 dias.



A amostra que foi armazenada à temperatura ambiente apresentou viabilidade nula desde a contagem inicial, e por esta razão não está representada na Figura 18. Notamos que a baixa temperatura garantiu a manutenção da viabilidade das células, mantendo ao final de 60 dias uma concentração celular elevada ($> 10^8$ UFC/g).

Para alimentos contendo probióticos, o produto final deve ter vida média variando de 15 a 30 dias, permanecendo com número elevado de células viáveis ($> 10^6$ UFC/mL) durante a vida de prateleira (BRASIL, 2000; TRABULSI; SAMPAIO, 2000).

Estudos demonstraram que a temperatura é crítica para a sobrevivência microbiana durante o armazenamento, e maiores taxas de sobrevida são obtidas em

baixas temperaturas de armazenamento (JOHNSON; ETZEL, 1993; GARDINER et al., 2000), o que corrobora com os presentes resultados, onde o armazenamento refrigerado garantiu a manutenção da viabilidade celular das culturas em pó secas por *spray drying* ao longo do tempo.

Os resultados podem ser comparados com os encontrados por SIMPSON et al. (2005), que avaliaram a viabilidade de 12 espécies de *Bifidobacterium* microencapsuladas por *spray drying*, com leite desnatado reconstituído com e sem adição de goma arábica. Os autores relataram que todas as amostras apresentaram contagens de células viáveis maiores de que 6 log UFC/g após 90 dias de estocagem a 4°C.

CSU et al. (2007) observaram a manutenção da viabilidade de *L. acidophilus* microencapsulado por *spray drying* com maltodextrina e goma arábica. A viabilidade celular esteve acima de 7 log UFC/g durante cinco semanas de armazenamento a 4 °C.

Teanpaisan et al. (2012) demonstraram que a viabilidade celular de *L. paracasei* SD1 armazenado em temperatura de 4 °C por 6 meses foi máxima, enquanto que as taxas de sobrevivência eram próximas a 0% quando a temperatura de estocagem era de 25 °C.

Em seus estudos, Hsiao et al. (2004) demonstraram que o armazenamento de culturas probióticas secas em frascos de vidro a baixas temperaturas (4 °C) pode aumentar a sua vida útil.

Inúmeros são os trabalhos que indicam que para uma manutenção da viabilidade de amostras probióticas secas em *spray drying*, temperaturas mais baixas de armazenamento são indicadas. Um outro fator que pode ter beneficiado a manutenção da viabilidade das células contidas nos pós foi o tipo de recipiente em que as amostras foram armazenadas. O armazenamento em frasco de vidro diminui a permeabilidade ao oxigênio, minimizando a taxa de mortalidade das células durante o armazenamento (SHAH, 2000).

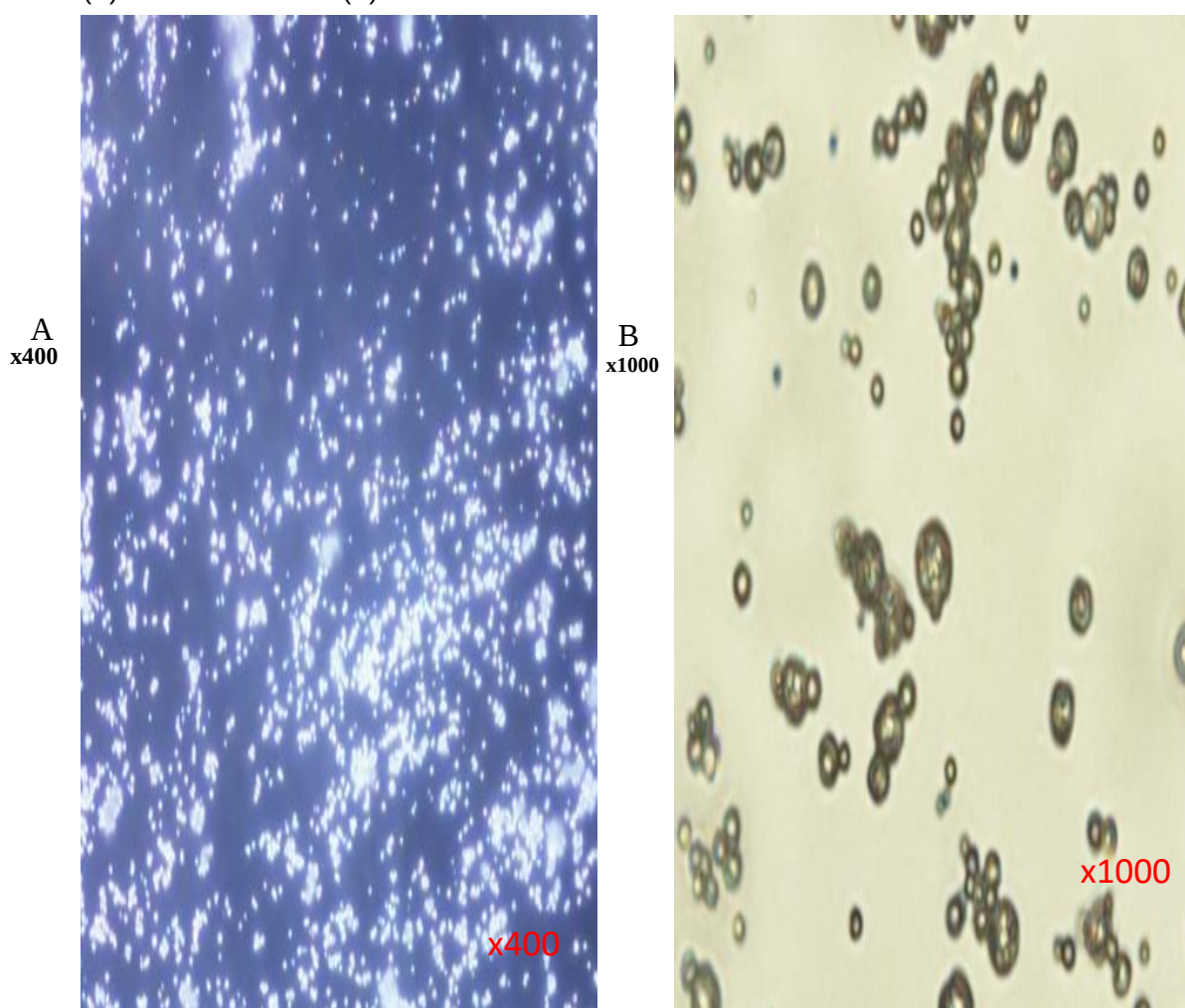
Estudos mostraram que os probióticos secos por *spray drying* têm um armazenamento estável de pelo menos 30 dias, em condições favoráveis de armazenamento (GARDINER et al., 2000; KEARNEY et al., 2009; SIMPSON et al., 2005; WANG et al., 2004). A legislação brasileira afirma que a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC (BRASIL, 2008). Portanto, o pó obtido enquadra-se na legislação.

5.4.3. ANÁLISE MICROSCÓPICA

Analizando-se a Figura 19, observa-se que o pó é formado por partículas esféricas, homogêneas e com superfície uniforme. As esferas apresentam, em sua maioria, superfície lisa, havendo algumas microcápsulas com leve rugosidade superficial e poucas estruturas não encapsuladas.

Também foi observado que as microesferas apresentaram variedade de tamanho, o que é uma característica típica de partículas produzidas por *spray drying*. Características morfológicas similares foram encontradas por Tonon, Grosso e Hubinger (2011).

Figura 19- Microscopia óptica das microcápsulas.
(A) aumento de x400 (B) aumento de x1000



Fonte: A autora

Arshady (1993) relata que a influência do tamanho da microcápsula sobre a estabilidade não é totalmente elucidada, embora alguns estudos estabeleçam que haja um tamanho ótimo que pode estar relacionado com a diminuição da estabilidade, devido a um maior grau de imperfeição. Partículas menores e mais uniformes são mais indicadas para manutenção da viabilidade durante o armazenamento (ANEKELLA, 2011).

6. CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que o soro de leite é um subproduto com potencial a ser utilizado no cultivo de *L. casei*, permitindo uma elevada produção de células e sendo uma opção de baixo custo quando comparado aos meios sintéticos.

O meio a base de soro de leite suplementado com 20 g/L de glicose se apresentou adequado para o crescimento de células de *L. casei*. A utilização deste meio de cultivo é uma forma de diminuir o impacto ambiental gerado pelo descarte deste resíduo, assim como resulta numa diminuição dos custos do processo fermentativo.

Os planejamentos experimentais permitiram determinar as melhores faixas de operação do *spray dryer* em termos da temperatura de entrada do ar e concentração de maltodextrina. Foi analisado a existência de correlação entre uma maior concentração de maltodextrina e diminuição de temperatura de ar de entrada, resultando em um pó com boas características macroscópicas e elevada concentração de células viáveis ($> 10^{10}$ UFC/g).

A maltodextrina mostrou-se como um eficiente adjuvante de secagem, conferindo às microcápsulas boas características físicas e biológicas.

A técnica de secagem por *spray drying* conferiu às microcápsulas características de umidade, molhabilidade e higroscopicidade satisfatórias, o que influenciou na estocagem das microcápsulas. Em um período de 60 dias sob refrigeração, as células mantiveram-se viáveis, com elevada concentração celular ($> 10^8$ UFC/g).

A análise térmica do material indicou uma temperatura de transição vítrea (T_g) acima da temperatura de armazenamento, o que garante a cristalização das microcápsulas.

As microcápsulas formadas revelaram-se na microscopia óptica como partículas esféricas, de superfície pouco rugosa e homogênea.

Os resultados mostram que a microencapsulação de células de *L. casei* utilizando a maltodextrina como agente encapsulante pode ser um meio alternativo para a obtenção de um produto probiótico em pó a ser incorporado em alimentos.

7. REFERÊNCIAS.

ABREU, L. R. Tecnologia de leite e derivados. **UFLA/FAEPE**, 215 .p, 1999.

ADHIKARI, B.; HOWES, T.; BHANDARI, B. R.; TROUNG, V. Effect of addition of maltodextrin on drying kinetics and stickiness of sugar and acid-rich foods during convective drying: experiments and modelling. **Journal of Food Engineering**,v.62, p.53-68, 2004.

AGUIRRE-EZKAURIATZA, E. J.; AGUILAR-YÁÑEZ, J. M.; RAMÍREZ-MEDRANO, A.; ALVAREZ, M.M. Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: Comparison of batch, continuous and fedbatch cultures. **Bioresour Technol**, v.101, n.8, p. 2837-2844, 2010.

ALAMPRESE, C.; FOSCHINO, R.; ROSSI, M.; POMPEI, C.; SAVANI, L. Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations. **International Dairy Journal**, v. 12, p.201-208, 2002.

ALEXANDER, R. J. Maltodextrins: production, properties, and applications. In: SCHENCK, F. W.; HEBEDA, R. E. (Ed.). Starch hydrolysis products: worldwide technology, production and applications. New York: **VCH Publishers**, p. 233-275, 1992.

ALMEIDA, K.E., BONASSI,I. A., ROÇA, R.O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. **Food Science and Technology**. v. 21, p. 187-192, 2001.

ALONSO, S.; HERRERO, M.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. RESIDUAL yoghurt whey for lactic acid production. **Biomass and Bioenergy**, v.34,n.7, p.931-938, 2010.

ALZAMORA, S. M., TAPIA, M. S., LOPEZ-MALO, A., WELTI-CHANES, J. The control of water activity. In P. Zeuthen, and L. Bogh-Sorensen (Eds.), **Food**

preservation techniques. Cambridge, UK: Woodhead Publishing, p. 126–153. 2003.

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

ANAL, A.K.; BHOPATKAR, D.; TOKURA, S.; TAMURA, H.; STEVENS, W.F. Chitosan alginate multilayer beads for gastric passage and controlled intestinal release of protein. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 29, p. 713–724, 2003.

ANAL, A.K.; STEVENS, W.F. Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 290, p. 45-54, 2005.

ANAL, A.K.; STEVENS, W.F.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C. Ionotropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 312, p. 166-173, 2006.

ANDERSON, D.M.W.; HOWLETT, J.F.; McNAB, C.G.A. The amino acid composition of the proteinaceous component of gum arabic (*Acacia senegal* (L.) Willd.). **Food Addit. Contam.** v.2, n.3, p.159-164, 1985.

ANEKELLA, K.; ORSAT, V. Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spraydrying.(Report). LWT - **Food Science and Technology**, v.50, n.1, p.17-25, 2013.

ANEKELLA,K. Microencapsulation of probiotics (*Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus*) in raspberry powder by spray drying: optimization and storage stability studies Master of Science. McGill University , 2011.

ANJO, D. L. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**. v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.

ANNAN N.T.; BORZA A.D.; TRUELSTRUP HANSEN L. Encapsulation in: ANNAN, N.T. et al. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v.41, p.184-193, 2008.

ANSELMO, G.C.S., EDUARDO, M.R.M., CAVALCANTI, M., ARRUDA, P. C., COELHO, M. Determinação da higroscopicidade do cajá em pó por meio da secagem por atomização. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n. 2 , 2006.

ANVISA, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. IX- Lista de Alegações de Propriedade Funcional Aprovadas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, julho de 2008.

ARSHADY, R. Microcapsules for food. J. Microencapsul., v.10, p.413-435, 1993.

AUDISIO, M.C.; OLIVER, G.; APELLA, M.C. Protective effect of *Enterococcus faecium* J96, a potential probiotic strain, on chicks infected with *Salmonella pullorum*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.63, n.10, p.1333-1337, 2000.

AXELSSON L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen, S.von Wright, A. and Ouwehand A. (Eds.), Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 3rd rev. and exp. ed. Marcel Dekker, Inc., New York, p.1-66, 2004.

BAILEY, J. Biochemical Engineering Fundamentals. Mac Graw-Hill, 1995.

BALDISSERA, A. C.; BETTA, F. D.; PENNA, A. L. B.; LINDNER, J. D.D. Alimentos funcionais: uma nova fronteira para o desenvolvimento de bebidas protéicas a base de soro de leite. **Semina: Ciências Agrárias**, . p.1497-1512, 2011.

BARBOSA, F. H. F.; BARBOSA, L. P. J. L.; ROSA, H. C.; SOUZA, M. R. Produção de bactérias lácticas probióticas (*Lactobacillus*) a partir de vinhoto de cana-de-açúcar suplementado com fontes de carbono alternativas para alimentação animal. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v. 11,n. 2, p. 64-66, 2011.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria. 2. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2003.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I; BRUNS, R. Planejamento e otimização de experimentos. UNICAMP, Campinas, p.66. 1996.

BEDDOW, J.K. Testing and characterization of powders and fine particles. London: Heyden, p195, 1980.

BERGEY, D. H.; HOLT, J. g. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9 ed. Lippincott Williams and Wilkins, 1994.

BERISTAIN, C.I.; VERNON-CARTER, E.J. Studies on the interaction of arabic (*Acacia senegal*) and mesquite (*Prosopis juliflora*) gum as emulsion stabilizing agent for spray-dried encapsulated orange peel oil. **Drying Technology**, v.13, n.1/2, p. 455–461, 1995.

BERTOLDI, F. C. Efeito do *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 na redução do sabor amargo da carne escura de atum. Florianópolis: UFSC, 61p. Dissertação Mestrado, 2003.

BHANDARI, B.R; DATTA, N., HOWES, T. Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. **Drying Technology**, v.15, n.2, p. 671–684, 1997.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v.35, n.2/3, p.125-131, 2002.

BIRCHAL, V. PASSOS, M. L.; WILDHAGEN, G.; MUJUMDAR, A. Effect of spray-dryer operating variables on the whole milk powder quality. **Drying Technology**, v. 23, p. 611-636, 2005.

BORGES, V. C. Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos. In: WAITZBERG, D. L. (Ed.). Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. 3. ed. São Paulo: Atheneu. 2000.

BOUKSAIM, M.; BENJOUAD, A.; JAMALY, N. Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. **British Microbiology Research Journal**, v. 1, n. 4, p. 79-94, 2011.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA Resolução RDC n.º 2, de 7 de janeiro de 2002. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA, Resolução n.º 18. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, abril de 1999. ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. IX-Lista de Alegações de Propriedade Funcional Aprovadas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, julho de 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Portaria no. 398, de 30 de abril de 1999. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em 06 novembro 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. , Resolução n.º 16. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, Agosto de 2005. ANVISA. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico de Identidade e

Qualidade de Bebida Láctea. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, Agosto de 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução no 05, de 13 de novembro de 2000. Padrão de identidade e qualidade de leites fermentados. Brasília, 2000.

BRAZEL, C.S. Microencapsulation: offering solutions for the food industry. **Cereal Foods World**, v.44, n.6, .p.388-393, 1999.

BRINK, M. Y., TODOROV, S.D. The effect of probiotics on production of antimicrobial compounds, resistance to growth at low pH and in the presence of bile, and adhesion of probiotic cells to intestinal mucus. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n.4, p.813-820, 2006.

BRINQUES, G.B. Otimização da produção de probióticos em biorreatores e suas aplicações em sistemas alimentícios sob forma imobilizada. Tese Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre- RS, 2009.

BROD, F. P. R. Avaliação de um secador vibrofluidizado. 2003. 336p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

BUITINK, J.; VAN DEN DRIES, I.J.; HOEKSTRA, F.A.; ALBERDA, M.; HEMMINGA, M.A., 2000. High critical temperature above T_g may contribute to the stability of biological systems. **Biophys. J.** v. 79, n.2, p.1119–1128, 2010.

BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Arch. Latino americanos de Nutricion.** v. 57, n. 4, p. 373-380, 2007.

CAI ,C.J.; THALER, B.; , LIU, D.W.; WANG, J.J.; QIAO, S.Y. Optimization of Spray-Drying Workflow as a Method for Preparing Concentrated Cultures

of *Lactobacillus fermentum*. **Journal of Animal and Veterinary Advances**. v. 11, n. 15, p. 2769-2774, 2012.

CAI, Y.Z.; CORKE, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. **J. Food Sci.**, v.65, n.7, p.1248-1252, 2000.

CALDER, P.C.; KEW, S. The immune system: a target for functional foods. *Br. J. Nutr.*, Wallingford, v.88, suppl.1, p.S165-S176, 2002.

CÂNDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. Alimentos funcionais. Uma revisão. *Boletim da SBCTA*. v. 29, n. 2, p. 193-203, 2005.

CARMO, A. P. Produção de cultura DVS 9 Direct Vat Set) para *Lactobacillus delbrueckii* cultivado em soro de queijo minas frescal. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 2006.

CARVALHO, N. C. DE. Adição de soro de leite bovino em preparações alimentares no combate à desnutrição. 2006. Acessado em: 24 de Junho de 2012.

CARVALHO, S.M.L. Determinação de isotermas de adsorção da farinha d'água obtida de mandioca (*Manihot esculenta*). Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Tecnologia de Alimentos) UFPA. Belém, 1994.

CARVALHO. W.; CANILHA, L.; SILVA, S.S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica**, n.23, p. 60-70, 2006.

CASTRO, H. P., TEIXEIRA, P. M., & KIRBY, R. Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and temospheres. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 172–176, 1995.

CASTRO, H.P., TEIXEIRA, P.M., KIRBY, R., Evidence in membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze-drying. **Journal of Applied Microbiology**. v. 82, p. 87–94, 1997.

CASTRO, C, FABIANE. P ; SILVA, CARINA. REIS E .; FRITZEN. F, CARLISE.B B; LORENZ, J.G.; SANT'ANNA, E.S. Bifidobacterium Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage *Journal of Food Engineering*, v.113, n.2, p.186-193, 2012.

CHAMPAGNE, C.P.; GARDNER, N.J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.45, p.61-84, 2005.

CHARTERIS, W. P., et al. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, v. 84, n, p. 759-768, 1998.

CHÁVARRI, M.; MARAÑÓN, I.; ARES, R.; IBÁÑEZ, F.C.; MARZO, F.; VILLARÁN, M.C. Microencapsulation of probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*. v. 142, n. 15, p. 185-189, 2010.

CHÁVEZ, B.E., LEDEBOER, A.M., Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying Technology*. v.25, n 7–8, p.1193– 1201, 2007.

CHEGENI, G.R.; GHOBADIAN, B. Effects of spray drying conditions on physical properties of orange juice powder. *Drying Technology*, v.23, n.3, p. 657-668, 2005.

CHRONAKIS, I.S. On the molecular characteristics, compositional properties and structural-functional mechanisms of maltodextrins: **A review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.38, p. 599-673, 1998.

COLLINS, J .K.; O'MAHONY, L.; FEENEY, M.; O'HALLORAN, S.; MURPHY L.; KIELY, B.; FITZGIBBON, J.; LEE, G.; O'SULLIVAN, G.; SHANAHAN F,

Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. **Aliment Pharmacol Ther.** v. 15, n.8, p. 1219-1225, 2001.

CORCORAN, B.M.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.; STANTON, C. Comparative survival of probiotic *Lactobacilli* spray dried in the presence of prebiotic substances. **J Appl Microbiol** n. 96, p.1024–1039, 2004.

COUTINHO, A. P. C. Produção E Caracterização de Maltodextrinas a partir de Amidos de Mandioca e Batata-Doce. Tese Doutorado. UEP, 151p, Botucatu- SP, 2010.

CRUZ, A.G.; ANTUNES, A.E.C.; SOUSA, A.L.O.P.; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I.; Ice-cream as a probiotic food carrier. **Food Research International.** n. 42,p.1233-1239, 2009.

DAIUTO, E. R.; CEREDA, M. P. Amido como suporte na desidratação por atomização e em microencapsulamento.In: Cereda MP, Vilpoux OF. (Coord). Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas sul americanas. São Paulo: Fundação Cargill. p.449-75, 2003.

DAVIDSON, R.H.; DUNCAN, S.E.; HACKNEY, C.R.; EIGEL, W.N.; BOLING, J.W. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. **Journal Dairy Sciences**, v.83, n.4, p.666-673, 2000.

DONBROW, M. Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy. Boca Raton: CRC Press, p.1-13, 1992.

DZIEZAK, J. Yeasts and yeast derivatives: applications. **Food Technology**, Chicago, v.41, n.2, p.122-125, 1987.

DZIEZAK, J.D. Microencapsulation and Encapsulated Ingredients. **Food Technology**, p. 136-151, 1988.

EASTMAN, J.E; MOORE, C.O. Cold-water soluble granular starch for gelled food composition. U.S. Pat. 4.465.702. 1984.

ELNAGGAR, Y.S.; EL-MASSIK, M.A.; ABDALLAH, O.Y.; EBIAN, A.E. Maltodextrin: a novel excipient used in sugar-based orally disintegrating tablets and phase transition process. **AAPS PharmSciTech.** v. 11, n.2, p. 645–651, 2010.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Statistical Databases. Agriculture.2005 < <http://www.fao.org/economic/ess/en/>>

FAO/WHO. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with live Lactic Acid Bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, 2001.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C.R.F. The effect of the immobilization of *L. acidophilus* and *B. lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. **Michwissenschaft**, v. 55, n. 9, p. 469-499, 2000.

FÁVARO-TRINDADE, C.S. Microencapsulação de probióticos. Em: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas. São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda, cap.10, p.239-254, 2001.

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

FÁVARO-TRINDADE, C.S., ROSSO, C.R.F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. **Journal of Microencapsulation** n. 19, p.485-494, 2002.

FERREIRA, C. L. L. F. Benefícios das culturas lácticas probióticas. In: OLIVEIRA, M. N.(Org.). Tecnologia de produtos lácteos funcionais. São Paulo: Atheneu Editora, cap.6, p. 213-234, 2009.

FERREIRA, C.L.L. Grupo de bactérias lácticas: caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: FERREIRA, C.L.L., ed. Prebióticos e Probióticos: atualização e prospecção. Viçosa: UFV, p.7-33, 2003.

FERREIRA, E. H. R.; CABRAL, J. R. A.; NARDELLI, P. M. Alimentos funcionais: mercado, regulamentação e benefícios à saúde. Leites e Derivado, São Paulo, n. 113, ano 18, 2009.

FITZSIMONS, S. M.; MULVIHILL, D. M. et al. Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. **Food Hydrocolloids**, v.11, n.4, p.62-69, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). 2001. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, <http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf> Acesso em 15 dez. 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Probiotics. New York, 2004. Disponível em:<http://www.webdietitians.org /Public/GovernmentAffairs/92_adap1099_cfm>. Acesso em 06 fev. 2012.

FRANCIS, F., SABU, A., NAMPOOTHIRI, K.M., RAMACHANDRAN, S., GHOSH, S., SZAKACS, G., PANDEY, A. Use of response surface methodology for optimizing processes parameters for the production of Alfa-amilase by *Aspergillus oryzae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 15, p. 107-115, 2003.

FRITZEN-FREIRE, C.B.; PRUDENCIO, ES .; AMBONI, R.D.M.C .; PINTO, S.S .; NEGRAO-MURAKAMI, A.N ; MURAKAMI, F.S. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. **Food Research International**, v.45, n.1, p.306-312, 2012.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl.Bacteriol.**, Oxford, v.66, p.365-378, 1989.

FURUTA, T.; HAYASHI, H.; OHASHI, T. Some criteria of spray dryer design for food liquid. **Drying Technology**. New York. v.12, n.1-2, p.151-177, 1994.

GARDINER G., STANTON C., LYNCH P.B., COLLINS J.K., FITZGERALD G., ROSS R.P. Evaluation of Cheddar Cheese as a Food Carrier for Delivery of a Probiotic Strain to the Gastrointestinal Tract. **Journal of Dairy Science** n.82, p.1379-1387, 1999.

GARDINER G.E., O'SULLIVAN E., KELLY J., AUTY M.A.E., FITZGERALD G.F., COLLINS J.K., ROSS R.P., STANTON Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. **Applied and Environmental Microbiology** n. 66, p. 2605-2612, 2000.

GARDINER, G .E. ; O'SULLIVAN, E .; KELLY, J .; AUTY, M. A ; FITZGERALD, G. F ; COLLINS, J. K .; ROSS, R P. ; Stanton, C. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.6, p.2605-12, 2000.

GARDINER, G.E.; ROSS, R.P.; WALLACE, J.M.; SCANLAN, F.P.; JAGERS, P.P.; FITZGERALD, G.F.; COLLINS, J.K.; STANTON, C. Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of cheddar cheese. **J. Agric. Food. Chem.**, Washington, v.47, n.12, p.4907-4916, 1999.

GLOBALFOOD. Soro um alimento saudável e base econômica para produtos inovadores. 2006. Disponível em: <<http://www.globalfood.com.br>>. Acesso em: 12 ago. 2012.

GOLOWCZYC, M. A.; GEREZ, C. L.; SILVA, J.; ABRAHAM, A.G.; DE ANTONI, TEIEIRA, P. Survival of spray-dried *Lactobacillus kefir* is affected by different protectants and storage conditions. **Bioprocessing and Biological engineering storage conditions**. v. 33, n. 4, p. 681-686, 2010.

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

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

GOMES, T. M. C. Produção de Hidromel: Efeito das Condições de Fermentação. Bragança: Instituto Politécnico de Bragança, 71p. Dissertação de Mestrado, 2010.

GOTTELAND, M., CRUCHET, S. Suppressive effect of frequent ingestion of *Lactobacillus johnsonii* La1 on *Helicobacter pylori* colonization in asymptomatic volunteers. **J Antimicrob Chemother** v. 51, p.1317-1319, 2003.

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

GOULA, A. M.; ADAMOPOULOS, K. G. Spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. The effect on powder properties. **Journal of Food Engineering**, v. 66, n. 1, p. 35-42, 2005.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. *Lancet*, London, v.360, p.512-518, 2003.

HAMERSKI, F. Estudo das variáveis no processo de carbonatação do caldo de cana-de-açúcar. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 149p, 2009.

HAVENAAR, R.; BRINK, T.; HUIS IN'T VELDT, J. H. J IN: FULLER, R. ed. Probiotics: the scientific basis. **London: Chapman and Hall**, p. 209-224, 1992.

HEGENBART, S. Encapsulated ingredients keep problems conversed. **Food Prod Des** v.3, p.28–34, 1993.

HOLZAPFEL, W.H., SCHILLINGER,U. Introduction to pre and probiotics. **Food Research International**, v. 35, p. 109-116, 2002.

HOSSAIN, M.D.; BALA, B.K.; HOSSAIN, M.A.;MONDOL, M.R.A. Sorption isotherms and heat of sorption of pineapple. **Journal of Food Engineering**, Barking, v. 48, n. 2, p.103-107, 2001.

HSIAO H.C., LIAN W.C., CHOU C.C. Effect of packaging conditions and temperature on viability of microencapsulated *Bifidobacteria* during storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture** n. 84, p.134-139, 2004.

INGHAM, S.C. Use of modified *Lactobacillus* selective medium and *Bifidobacterium* iodo acetate medium for differential enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in powdered nutritional products. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.62, n.1, p.77-80, 1999.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos, v. 1, 4 ed. São Paulo, ANVISA, 2008.

ITSARANUWAT, P.; SHAL-HADDAD, K.; ROBINSON, R.K. The potential therapeutic benefits of consuming 'health-promoting' fermented dairy products: a brief update. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, n. 4, p. 203-210, 2003.

IVANOVSKA, PETRESKA., T., PETRUŠEVSKA-TOZI, L; KOSTOSKA, M. D., GESKOVSKI, N. GROZDANOV, A., STAIN, C., STAFILOV, T., MLADENOVSKA, K. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* in chitosan-Ca-alginate

microparticles using spray-drying method Macedonian. **Journal of Chemistry & Chemical Engineering**; v. 31, n.1, p-115, 2012.

JACKSON, L. S., LEE,K. Microencapsulation and Food Industry, *Lebensmittel-Wissenschaftat Technologie*, v. 24, p. 289 -297, 1991.

JAY, J. M. Modern Food Microbiology. 5. ed. London: Chapman & Hall, 1996.

JAYA,S.; DAS, H. Glass Transition and Sticky Point Temperatures and Stability Mobility Diagrama of Fruit Powders. **Food and Bioprocess Technology**. v. on line, p. 1-7, 2009.

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

JIN, L.Z.; MARQUARDT, R.R.; BAIDOO, S.K. Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99 and 987P by the *Lactobacillus* isolates from porcine intestine. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Sussex, v.80, n.5, p.619-624, 2000.

JOHNSON, J. A. C.; ETZEL, M. R. Inactivation of lactic acid bacteria during spray drying, p. 98–107. In G. V.Barbosa-Canovas and M. R. Okos (ed.), **Food dehydration**. Institute of Chemical Engineering, New York,N.Y.1993.

JONG-KWANG, L.; JI-EUN, E.; HYUN-SOO, S.; WEON-SUN, S.; GI-SEONG, M. Optimal production of fermented whey presenting bifidogenic growth stimulator activity. **Food Science and Biotechnology**, 2011, v.20, n. 5, p.1451-145, 2010.

JOSHI, V. S.; THORAT, B. N. Formulation and Cost-Effective Drying of Probiotic Yeast. **Drying Technology**, v. 29, p. 749-757, 2011.

JULIANO, P; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Food Powders Flowability Characterization: Theory, Methods, and Applications. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, p. 211-239, 2010.

KAILASAPATHY, K. Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, **Nutrition and Natural Resources** v. 4, n. 6, 2009.

KAILASAPATHY, K. Protecting probiotics by microencapsulation. **Microbiology Australia**, v. 24, n. 1, p.30-31, 2003.

KAILASAPATHY, K.; CHIN J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, p. 80-88, 2000.

KAILASAPATHY, K.; MASONDOLE, L. Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* and their effect on texture of feta cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 60, p. 252-258, 2005.

KAJIYAMA, T; PARK, K. J. Influência da umidade inicial da alimentação no tempo de secagem em secador atomizador. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.10, n.1, p.1-8, 2008.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria **Ant. v. Leeuwenhoek**, vol. 49, pp. 209–224, 1983.

KANDLER, O.; N. WEISS. Regular, non-sporing Gram-positive rods, p. 1208–1234. In: P. H. A. Sneath, N. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. William and Wilkins, Baltimore, 1986.

KAUR, I.P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v.15, p.1-9, 2002.

KEARNEY, N.; MENG, X. C.; STANTON,C.; J. LLY, J.; FITZGERALD,G.F.; . ROSS, R.P Development of a spray dried probiotic yoghurt containing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. **International Dairy Journal** , v. 19, n. 11, p. 684-689, 2009.

KELESIDIS, T. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. **Therap. Adv. Gastroenterol.** v.5, n. 2, p. 111-125, 2012.

KENNEDY, M., READER. S. L., DAVIES, R. J. The kinetics of developing fermentation media. **Process Biochemistry**, n.29, p.529-534, 1994.

KENNEDY, J.F.; KNILL, C.J.; TAYLOR, D.W. Maltodextrins. In: KEARSLEY, M.W.; DZIEDZIC, S.Z. **Blackie Academic & Professional**, p.65-82, 1995.

KENYON, M.M. Modified starch, maltodextrin, and corn syrup solids as wall materials for food encapsulation. In: RISCH, S.J.; REINECCIUS, G.A. **Encapsulation and controlled release of food ingredients**. Washington, DC: ACS, 1995. p.42-50, 1995.

KIM, H. S., KAMARA, B. J.; ENDERS Jr. G. L. Method for the preparation of stable microencapsulated lactic acid bacteria. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, p. 253-257, 1988.

KOC B., YILMAZER M.S., BALKIR P., ERTEKIN F.K. Spray drying of yogurt: Optimization of process conditions for improving viability and other quality attributes. **Drying Technology** v.28, p. 495-507, 2010.

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, n. 3, p. 329-347, 2008.

KONEMAN, E. W. WINN JR, W., ALLEN, S.; JANDA, W., PROCOP, G., SCHRENBARGER, P., WOODS,G. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6 ed. Lippincott: Williams and wilkins, 1736, 2005.

KONINGS, W. N.; KOK, J.; KUIPERS, O. P. & POOLMAN, B. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. **Current Opinion in Microbiology**, v.3, n.3, p.276-282, 2000.

KOOP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. **J Am Diet Assoc.** v. 101, n. 2, p. 229-38, 2001.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics:a review. J. **Am. Diet. Assoc.**, Chicago, v.101, p.229-241, 2001.

KRISSANSEN, G.W. Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. **Journal of the American College of Nutrition**. v.26, n. 6, p. 713S–723, 2007.

KUMAR, M.; GHOSH, M.; GANGULI,A. Mitogenic response and probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from indigenously pickled vegetables and fermented beverages. **World Journal of Microbiology & Biotechnonology**, v. on line, p. 1-9, 2011.

KUMAR, P.; MISHRA ,H.N.Yoghurt powder - A review of process technology, storage and utilization. **Food and Bioproducts Processing** v. 82, p.133-142, 2004.

LANNES, S. C. S; MEDEIROS, M. L. Processamento de achocolatado de cupuaçu por spray-dryer. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 39, 2003.

LEE, P. C., BOCHNER, B. R., AMES, B. N. AppppA, heat-shock stress, and cell oxidation. **Proc. Natl. Acad.Sci.** v. 80, n. 24, p. 7496-7500, 1983.

LEE, Y.K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, p. 211, 1999.

LEFEBVRE, A.H., Atomization and Sprays. CRC Press, New York, 1989.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 2000.

LEITE, M. T. Otimização da produção do ácido láctico através da fermentação do soro de queijo *por lactobacillus helveticus*. Tese de doutorado. 179p. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG, 2006.

LERAYER, A. L. S.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; VIALTA, A. Culturas lácticas e probióticas: identificação, classificação, detecção e aplicação tecnológica. In: OLIVEIRA, M.N. (Org.). **Tecnologia de produtos lácteos funcionais**. São Paulo: Atheneu Editora, cap. 4, p. 125-186, 2009.

LESLIE, S.B., ISRAELI, E., LIGHTHART, B., CROWNE, J.H., CROWNE, L.M., 1995. Trehalose and sucrose protect both membrane and proteins in intact bacteria during drying. **Applied and Environmental Microbiology** . v.61, n.10, p.3592–3597, 1995.

LI, J. Factorial Designs, Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, v. 1, p. 364-378, 2003.

LIEVENSE, L. C., VAN'T RIET, K. Convective drying of bacteria. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 50, p. 46-60, 1993.

LILLY, D. M ; STILLWELL, R. H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, p. 747-748, 1965.

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

MACHADO, R.M.G., FREIRE, V. H., SILVA, P. C., FIGUERÊDO, D. V., FERREIRA, P. E. Controle ambiental nas pequenas e médias indústrias de

laticínios. Projeto Minas Ambiente. Belo Horizonte: SEGRAC Editora e Gráfica Ltda, 223. p., 2002.

MAFART, P. Ingenieria industrial alimentaria. Zaragoza, Ed. Acribia, 1994.

MAGALHÃES NETTO, F. Influência da atividade de água na temperatura vítrea. In: JARDIM, D. C. P.; GERMER, S. P. M. Atividade de água em alimentos. Campinas: ITAL, p. 4-14, 1997.

MAHDAVIANI, P ; JAMALIFAR, H ; BAEERI, M ; DEHGHAN, G ; ABDOLLAHI, M On the benefit of whey-cultured *Lactobacillus casei* in murine colitis. **Journal of physiology and pharmacology.**, v.62, n.3, p.341-6, 2010.

MAKRAS, L.; DE VUYST, L. The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 1049-1057, 2006.

MARAGKOUDAKIS, P.A.; ZOUMPOPOULOU, G.; MIARIS, C.; KALANTZOPOULOS, G.; POT, B.; TSAKALIDOU, E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 3, p. 189-199, 2006.

MARRET, N. Manufacturer says refinery tech aids whey process ‘purity’. 2009.

MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine**, Buffalo, v. 9, n. 2, p. 136- 156, 2004.

MARTÍNEZ-CUESTA, M. C.; PALENCIA DE, P.; REQUENA, T.; PELÁEZ, C. Enzymatic ability of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL 731 for flavor development in cheese. **International Dairy Journal**, v. 11, p.577-585, 2001.

MARTONI, C., BHATHENA, J., URBANSKA, A. M., PRAKASH, S. Microencapsulated bile salt hydrolase producing *Lactobacillus reuteri* for oral targeted delivery in the gastrointestinal tract. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 81, n. 2, p. 225–233, 2008.

MASTERS, K. Analytical methods and properties of dried dairy products. In R. Hansen (Ed.), *Evaporation, membrane filtration and spray drying in milk powder and cheese production* Vanlose, Denmark: **North European Dairy Journal**, p. 393–403, 1985.

MATHARA, J. M.; SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; FRANZ, C.; KUTIMA, P. M.; MBUGUA, S. K.; SHIN, H. K.; HOLZAPFEL, W. H. Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 57-64, 2008.

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

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

MENRAD, K. Market and marketing of functional food in Europe. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 181-188, 2003.

MESTRY, A. P.; MUJUMDAR, A.S.; THORAT, B.N. Optimization of Spray Drying of an Innovative Functional Food: Fermented Mixed Juice of Carrot and Watermelon. **Drying Technology**. v. online, p. 1-11, 2011.

MIRHABIBOLLAHAI, B.M. The effect of mode of DNA replication on the resistance of *Salmonella typhimurium* LT2 to physical stress. Tese de Doutorado, University of Reading, UK, 1988.

MONTEIRO, R. C. B. Resposta ao estresse em *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20. In: *Microbiologia Agrícola*, p.59. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999.

MORAES, F. P; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutraceuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

MUCCHETTI, G.; NEVIANI E. Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia: qualità e sicurezza. Tecniche Nuove, Milão, Itália, 2006.

MUTHUKUMAR, M., D. MOHAN AND D. RAJENDRAN, Optimization of mix proportion of mineral aggregates using box behneken design of experiments. **Cem. Concr. Comp.**, v. 25, p. 751-758, 2003.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W.R.; CLEMENS, R.A . Probiotic spectra of lactic, in: NAIDU, A.S., CLEMENS, R.A. Probiotics. In: NAIDU, A.S. **Natural food antimicrobial systems**. Boca Raton: CRC, p.431-462, 2000.

NAIDU, A.S.; BIDLACK, W.R.; CLEMENS, R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38, n.1, p.13-126, 1999.

NATH, S.; SAPATHY, G. R. A sistematic approach for investigation of spray drying process. **Drying Technology**, v. 16, n. 6, p. 1173-1193, 1998.

NEOTTI, R.H.K. Protótipo para interpolação de dados experimentais de bioprocessos utilizando bezier. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel de Ciências da Computação) URB, Blumenau, 2001.

NGUYEN, T.; CHAMPAGNE, C.P .; LEE, B. H ; GOULET, J. Growth of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* on tofu whey. **International Journal of Food Microbiology**, v.89, n.1, p.67-75, 2003.

NIST/SEMATECH. e-Handbook of Statistical Methods.2011. Acessado em 23 de abril de 2012 4, 4.1, 5.2nutraceuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Passo Fundo, v. 3, n. 2,p. 109-122, 2006.Disponível em:<<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>>.

O'RIORDAN, K., ANDREWS, D., BUCKLE, K., CONWAY, P., 2001. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. **Journal of Applied Microbiology** v. 91, n.6, 1059–1066, 2001.

O'SULLIVAN, D. Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1751–1760, 2001.

OAKLEY, D.R. Produce uniform particles by spray-drying. **Chemical engineering progress**, p. 48-54, October, 1997.

OGAWA, M; SHIMIZU, K.; NOMOTO, K.; TANAKA, R.; HAMABATA, T.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, T.; TAKEDA, Y. Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.68, n.1-2, p.135-140, 2001.

OLIVEIRA, A.C. Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por spray drying e leite de jorro. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

OLIVEIRA, M. N, K., SIVIERI ., ALEGRO, J. H. A., SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira e Ciências Farmacêuticas**, vol. 38, n. 1, 2002.

OLIVEIRA, M.N. Probióticos: seus benefícios a saúde humana. **Nutrição em Pauta**, v. 15, n.87, 2007.

OLIVEIRA; O.W., PETROVICK, P.R. Secagem por aspensão (spray drying de extratos vegetais: bases e aplicações. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p. 641-650, 2012.

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

PALANCA, V.; RODRÍGUEZ, E.; SEÑORÁNS, J.;REGLERO, G. Bases científicas para el desarrollo de protuctos cárnicos funcionales com actividad biológica combinada. **Alimentos funcionales**, Nutrición Hospitalaria, Madrid, v. 21, n. 2, p. 199-202, 2006.

PANESAR, P.S., KENNEDY J.F., GANDHI D.N., BUNKO K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry** .v.105, p. 1–14, 2007.

PANESAR,P. S.; KENNEDY, J. H.; KNILL, C.J.; KOSSEVA, M.R.Production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus casei* from whey. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, p. 219-226, 2010.

PAROLO, C.C.F. Estudo dos *Lactobacilos* no biofilme dental.Porto Alegre: UFRS, 163p. Tese de Doutorado, 2009.

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

PERÀZIO, B. A. A. Efeito dos pontos axiais centrais sobre a eficiência do delinheamento composto central. Dissertação de Mestrado. UFV, Viçosa, 2010.

PERNI, S.; ANDREW, W. P.; SHAMA G. Estimating the maximum growth rate from microbial growth curve: definition is everything. **Food Microbiology**, London, v. 22, p. 491-495, 2005.

PERRONE, I. T. Soro de Leite: Concentração, cristalização da lactose e secagem. Tese de Doutorado, UFV, Viçosa, Minas Gerais, 86p, 2010.

PESCUMA, M.; HÉBERT, E. M .; BRU, E .; FONT DE VALDEZ, G.; MOZZI, F. Diversity in growth and protein degradation by dairy relevant lactic acid bacteria species in reconstituted whey. **The Journal of dairy research**, v.79, n.2, p.201-208, 2012.

PICOT, A. ; LACROIX, C Production of Multiphase Water Insoluble Microcapsules for Cell Microencapsulation Using an Emulsification/Spray drying Technology. **Journal of Food Science**, v. 68, n.9, p.2693-270, 2003.

POMBRIRO, A. J. L. O. Técnicas e operações unitárias em químicas laboratorial. 3 ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1998.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMAN-CALDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.13, p.3-11, 2002.

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.

RANDALL, R.C.; PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A.97 The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic. **Food Hydrocol.**, v.2, n.2, p.131-140, 1988.

RAWEE TEANPAISAN, R.; CHOORUK. A ; WANNUN.A .; WICHIENTHOT, S ; PIWAT,S.SONGKLANAKARIN.Survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* SD1 in milk powder using spray drying. **Journal of Science and Technology**, v.34, n.3, p.247, 2012.

RÉ, M. I. Microencapsulation by Spray Drying. **Drying Technology**. V. 16, n, 6, p. 1195-1236, 1998.

REIG, A. L. C.; ANESTO, J. B. Prebióticos y probióticos, una Relación Beneficiosa. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. **Revista Cubana de Alimentación e Nutrición**. v. 16, n. 1, p. 63-8, 2002.

REINECCIUS, G.A. Encapsulation and controlled release of food ingredients. Washington, DC: ACSp.2-7. (ACS Symposium. Series, 590), 1995.

REINECCIUS, G.A. Flavor Encapsulation. **Food Reviews International**. V. 5, n. 2, p.147-176, 1989.

REMILI, H.; BOUSSARD, P.; DEVLEESCHOUWER, M. Microbiological quality of spray-dried pharmaceutical plants extracts. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.1, p.265-8, 1994.

RISCH, S.J. Encapsulation: overview of uses and techniques. In: RISCH, S.J.; REINECCIUS, G.A. Encapsulation and controlled release of food ingredients. Washington, DC: ACS, p.2-7, 1995.

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

RIZQIATI, H .; BSL JENIE, BSL .;NURHIDAYAT, N .; NURWITRI, C.Survival of *Lactobacillus plantarum* Encapsulated with Skim Milk and rabic Gum after Spray Drying and Its Viability during Storage.**Journal of Animal Production**, v.10, n.3, p.179, 2008.

ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics.**Digestive and Liver Disease**, v.34, suppl.2, p.S105-S110, 2002.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics: the concept revisited. **J.Nutr**, v.137, p.830S-837S, 2007.

ROBINSON, R. K. **Moderny Dairy Techonology**. London,v.1, 438p, 1986.

RODRIGUEZ, J.M. Antimicrobial spectrum, structure, properties and mode of action of nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. **Food Science and Technology International**, New York, v.2, n.2, p.61-68, 1996.

RODRÍGUEZ-HERNANDEZ, G. R. GONZALEZ-GARCIA, R., GRAJALES-LAGUNES, A., RUIZ-CABRERA, M.A., ABUD-ARCHILA, M. Spray-drying of cactus pear juice (*Opuntia streptacantha*): effect on the physicochemical properties of powder and reconstituted product. **Drying Technology**, v. 23, n. 4, p. 955-973, 2005.

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

ROOS, Y. H. Glass transition temperature and its relevance in food processing. **Annual Review of Food Science and Technology**. v. 1, p. 469-496, 2010.

ROOS, Y. H. Importance of glass transition and water activity to spray drying and stability of dairy powders. **Lait**, v. 82, p.475–484, 2002.

ROSA, P. R. F. Produção de probióticos com *Lactobacillus* imobilizados em alginato de cálcio em pregando soro de queijo. Dissertação (MESTRADO)-Universidade Federal de Uberlândia- Uberlândia-MG, 2010.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I.J.; TALMON, Y. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. **J. Agr. Food Chem.**, v.38, p.1288-1294, 1990.

ROSS, R.P., DESMOND, C., FITZGERALD, G.F., STANTON, C., Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. **Journal of Applied Microbiology** v. 98, p. 1410–1417, 2005.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. **Handbook of pharmaceutical excipients**. London, Pharmaceutical Press, 2006.

SAAD, S. M. I. Probióticos e Prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J.A.F. Probióticos e Prebióticos em alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas. 1. Ed. São Paulo: Livraria Varela, 2011.

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

SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.8, p.341-347, 1998.

SANTANA, R. S., COSTA, S.A., ABREU, C.A.M., ALBURQUERQUE, S. S. M.C. Separação de proteínas do soro de queijo por adsorção utilizando hidroxiapatita e carvão ativado como adsorventes. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**. Juiz de Fora, n. 345, v. 60, p. 239-242, 2005.

SANTIVARANGKNA C, KULOZIK U, FOERST P.. Alternative drying process for the industrial preservation of Lactic acid starter cultures. **Biotechnol Progr** v. 23, p.302-15, 2007.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST,P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes, **J Appl Microbiol**, v.105, p.1-13, 2008.

SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; HOLZAPFEL, W. H. In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1289-1297, 2005.

SCHMIDELL, W., Microorganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: SCHMIDELL, W., LIMA, U., AQUARONE, E., BORZANI, W., **Biotecnologia Industrial**, v. 2 ,1º ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA, 2001.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, suplem., p. 361S-364S, 2001.

SGARBIERI,V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**. Campinas. V. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.

SHAH, N.P. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. **J. Dairy Sci.**,v. 83, p. 894-907, 2000.

SHAH, N.P.; RAVULA, R.R. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. **The Australian journal of dairy technology**, v. 55, n. 3, p. 139-144, 2000.

SHAHBAZI, A.; MIMS, M. R ; LI, Y. ; SHIRLEY, V. ; IBRAHIM, S. A ; MORRIS, A.Lactic acid production from cheese whey by immobilized bacteria. **Applied biochemistry and biotechnology**, v.121-124, p.529-540, 2005.

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

SHEU,T.Y.; MARSHALL, R. T. Microentrapment of Lactobacilli in calcium alginate gels. **Journal of food science**, v. 54, n. 3, p. 557-561,1993.

SHI,X.Y.; TAN,T.W. Preparation of chitosan/ethylcellulose complex microcapsule and its application in controlled release of vitamin D2. **Biomaterials**, Oxford, v. 23, p. 44669-4473, 2002.

SHORTT, C., The probiotic century: Historical and current perspectives. Food Science; Technology, New Holland, v. 10,n. 12, p. 411-417, 1999.

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

SILVA, J.; CARVALHO, A.S.; TEIXEIRA, P.; GIBBS, P. A. Bacteriocin production by spray dried lactic acid bacteria. **Letters Applied Microbiology**, v. 62, p. 47-55, 2002.

SILVA, M.R. da Efeito de uma bebida láctea fermentada e fortificada com ferro no estado nutricional de ferro em pré escolares. Tese (MAGISTER SCIENCE)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 75 p, 2000.

SILVEIRA, P. R.; ABREU, L.R. Rendimento e composição físico-química do queijo prato elaborado com leite pasteurizado pelo sistema HTST e injeção direta de vapor. **Ciências Agrotécnicas**, v.27, n.6, p.1340-1347, 2003.

SILVEIRA, P. R.; ABREU, L.R. Rendimento e composição físico-química do queijo prato elaborado com leite pasteurizado pelo sistema HTST e injeção direta de vapor. **Ciências Agrotécnicas**, v.27, n.6, p.1340-1347, 2003.

SIMPSON P.J., STANTON C., FITZGERALD G.F., ROSS R.P. Intrinsic tolerance of Bifidobacterium species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. **Journal of Applied Microbiology** v. 99, p.493-501, 2005.

SIMPSON, PJ ; STANTON, C ; FITZGERALD, GF ; ROSS, RP. Intrinsic tolerance of Bifidobacterium species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage .**Journal Of Applied Microbiology**, v.99, n.3, p.493-501, 2005.

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

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. D. S.; MEDEIROS, A. B. P.; YAMAGUISHI, C. T.; DE DEA LINDNER, J.; PANDEY, A.; THOMAZ-SOCOL, V.

The potential of the probiotics: a review. **Food Technology and Biotechnology**, Curitiba, v. 48, n. 4, p. 413-434, 2010.

SOUZA, C.R.F. Estudo comparativo da produção de extrato seco de Bauhinia forficata Link pelos processos spray-dryer e leito de jorro. Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 208p, 2003.

SOUZA, P. H.M.; SOUZA NETO, M, H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA**.v. 37, n. 2, p.127-135, 2003.

STANTON, C., DESMOND, C., COAKLEY, M., COLLINS, J.K., FITZGERALD, G. AND ROSS, R.P. Challenges facing development of probioticcontaining functional foods. In: Handbook of Functional Fermented Foods, Ch. 11 ed. Farnworth, E.R. Boca Raton, FL: CRC Press., 2003.

STANTON, C.; GARDINER, G.; LYNCH, P.B.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Probiotic cheese. **International Dairy Journal**, v.8, p.491-496, 1998.

STILES M.E., HOLZAPFEL W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology** v. 36, p.1-29, 1997.

STRAATSMA, J., HOUWELINGEN, V.G., STEENBERGEN, A.E., JONG, P.D. Spray drying of food products:1. Simulation model. **Journal of Food Engineering**. v.42, n.2,p. 67–72, 1999.

SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate- starch and evalution of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghut. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 1-2, p. 47-55, 2000.

SUNNY-ROBERTS EO, KNORR . The protective effect of monosodium glutamate onsurvival of Lactobacillus rhamnosus GG and Lactobacillus rhamnosus E-97800 strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders. **Int Dairy** v. 19. P.209–214, 2009.

SZAJEWSKA; MRUKOWICZ, 2005 SZAJEWSKA, H.; MRUKOWICZ, J. Meta-analysis: non-pathogenic yeast *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic - associated diarrhoea. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, Varsóvia, v. 22, n. 3, p. 365-372, 2005.

TANGO, M.S.A .; GHALY, A.E. Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch conditions. **Biomass and Bioenergy**, v.16, n.1, p.61-78, 1999.

TEANPAISAN, R.; CHORUK, A.; WANNUM, A.; WICHIENTHOT, S.; PIWAT, S. Survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* SD1 in milk powder using spray drying. Songklanakarin **J. Sci. Technol.** v. 34, n. 3, p. 241-245, 2012.

TEIXEIRA, P.; CASTRO, H.; KIRBY, R. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Applied Microbiology**.v. 8, p. 456–462, 1995.

TEIXEIRA, S. M. B. Elaboração de bebida láctea fermentada utilizando soro de ricota. Dissertação de Mestrado- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 63p, 2002.

TEIXEIRA, P.; CASTRO, H.; MOHA, C.; CSI-FARKAS .; KIRBY, R. Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress J Appl Microbiol. v.83, n.2, p.219-26, 1997.

TIMBERS, B. J., MATHEW, A., E KOHLER, H. m., Real Time Gas Moisture Based control **Approaches for food dryin Processes**, Dewcon Instruments Inc., 1997. 298 p, 1997.

TONON, R. V.; GROSSO, C. R. F.; HUBINGER, M. D. Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 282-289, 2011.

TONON, R.V., BRABET, C., HUBINGER, M. D. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carregados sobre as propriedades físico-químicas do suco de açaí em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, 444-450, 2009.

TONON, R.V.; BRABET, C.; HUBINGER, M.D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. **J Food Eng**. v. 88, p.411-418, 2008.

TRABULSI, L.R.; SAMPAIO, M.M.S.C. Probióticos, prebióticos e simbióticos. In: TRABULSI, L.R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. Os probióticos e a saúde infantil. São Paulo: Nestlé, 15p, 2000.

TRINDADE, B. Material didático de apoio à disciplina de Técnicas de Análise de Materiais, 2007.

TRINDADE, M.C. Estudo da recuperação de ácido láctico proveniente do soro de queijo pela técnica de membranas líquidas surfactantes. p. 105 2002. Dissertação (MAGISTER SCIENCE). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte, 2002.

TURCHIULI, C.; GIANFRANCESCOA, A.; PALZERC, S.; DUMOULINA, E. Evolution of particle properties during spray drying in relation with stickiness and agglomerationcontrol. **Powder Technology**.v.25, p. 433–440, 2011.

VAN DE WATER, J. Yogurt and immunity: the health benefits of fermented milk products that contain lactic acid bacteria. In: FARNWORTH, E.R., ed. Handbook of fermented functional foods. Boca Raton: CRC Pressp.113-144, 2003.

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

VILELA, S. C. Cifra de transição em queijos. Informativo Hala Biotec CHR Hansesn, n. 108, , 2009.

VILLANI, F.; PEPE,O.; MAURIELLO,G.; SALZANO, G.; MOSCHETTI,G.; COPPOLA, S. Antilisterial activity of thermophilin 347, a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.25, n.2, p.179-190, 1995.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v.10, p.271-275,2000.

VISSOTO, F. Z.; MONTENEGRO, F. M.; SANTOS, J. M.; OLIVEIRA, S. J. R. Avaliação da influencia dos processos de lecitinação e de aglomeração nas propriedades físicas de achocolatado em pó. **Ciênc. Tecnol. Alimentos**. Campinas, v. 26, n. 3, p. 666-671, 2006.

WALSTRA, P. G.; VIOTTO, W. H. Fabricação de queijo petit suisse por ultrafiltração de leite coagulado. Efeito do tratamento térmico do leite no desenvolvimento da membrana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p. 267-272, 2001.

WALTON, D. E. The morphology of spray-dried particles a qualitative view. **Drying Technology**, v. 18, n. 9, p. 1943-1986, 2000.

WANG C.-Y., LIN P.-R., NG C.-C., SHYU Y.-T. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. **Anaerobe**, v. 16p.578-585, 2012.

WANG Y.C., YU R.C., CHOU C.C. Viability of lactic acid bacteria and Bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. **International Journal of Food Microbiology**. v. 93, p.209-217, 2004.

WEIHUAN, F.; MINGHUA, S.; LIQUAN, H.; QINJUN, S.; JIAN, C. Growth of lactobacilli, Staphylococcus aureus and Escherichia coli in normal and mastitic milk and whey. **Veterinary Microbiology**, v.37, n.1, p.115-125, 1993.

WEINBRECK F., BODNÁR I., MARCO M.L. Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products. **International Journal of Food Microbiology** v. 136, p. 364-367, 2012.

WILLERS, J. L., MILLIKEN, G. A., JENKINS, J. N., O'HARA, C. G., GERARD, P. D., REYNOLDS, D. B., BOYKIN, D. L., GOOD, P.V., HOOD, K.B. Defining the experimental unit for the design and analysis of site-specific experiments in commercial cotton fields. **Agricultural Systems**, v. 96, p. 237-349, 2008.

WIRJANTORO, T.I.; PHIANMONGKOL, A. The Viability of Acid Bacteria and Bifidobacterium bifidum in Yoghurt Powder During Storage. **Journal of Natural Sciences**, v. 8, n. 1, p. 95-104, 2009.

YALCIN, A. S. Emerging therapeutic potential of whey proteins and peptides. **Current Pharmaceutical Design**, Haydarpasa-Istanbul, v. 12, n. 13, p. 1637-1643, 2006.

YING D.Y., PHOON M.C., SANGUANSRI L., WEERAKKODY R., BURGAR I., AUGUSTIN M.A. Microencapsulated Lactobacillus rhamnosus GG Powders: Relationship of Powder Physical Properties to Probiotic Survival during Storage. **Journal of Food Science**, 2010.

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

YOKOYA.; MANFIO, G. P.; VARIANE, S. F. Curso de Treinamento: Bactérias Lácticas na Fermentação Alcoólica, Campinas: Fundação de Pesquisas e Tecnologia “ André Tosello”, p.167, 1997.

YOW, H. N., ROUTH, A. F. Release profiles of encapsulated actives from colloidosomes sintered for various durations. **Langmuir**. v. 6;25, n.1, p.159-66, 2009.

ZAYED, G.; ROOS, Y.H. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. **Process Biochemistry**, v.39, p.1081-1086, 2004.

ZENITH INTERNATIONAL. Functional dairy drinks.2007. Disponível em: <www.zenith.com>. Acesso em: 23 out. 2012.

ZHAO, R. et al. Measurement of particle diameter of *Lactobacillus acidophilus* microcapsule by spray drying and analysis on its microstructure. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.1349-1354, 2008.