



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

CLARICE GEBARA MURARO SERRATE CORDEIRO TENÓRIO

**MICROENCAPSULAÇÃO DE *Lactobacillus acidophilus* E APLICAÇÃO EM
QUEIJO PRATO**

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA
UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTORA EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Profa. Dra. Mirna Lucia Gigante

ORIENTADORA

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida por Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro Tenório, aprovada pela comissão julgadora em ___/___/___ e orientada pela profa. Dra. Mirna Lucia Gigante.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2012.

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

T258m Tenório, Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro, 1980-
Microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* e
aplicação em queijo prato / Clarice Gebara Muraro Serrate
Cordeiro Tenório. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Mirna Lúcia Gigante.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Probióticos. 2. Microencapsulação. 3. Queijo
prato. 4. *Lactobacillus acidophilus*. 5. Proteínas do
soro do leite. I. Gigante, Mirna Lúcia. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and its
application in prato cheese.

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Probiotic

Microencapsulation

Prato cheese

Lactobacillus acidophilus

Whey proteins

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Mirna Lúcia Gigante [Orientador]

Adriane Elisabete Antunes de Moraes

Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá

Izildinha Moreno

Data da defesa: 20-07-2012

Programa de Pós-Graduação: Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mirna Lucia Gigante
(Orientadora)

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

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
(Membro Titular)

Profa. Dra. Izildinha Moreno
(Membro Titular)

Profa. Dra. Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá
(Membro Titular)

Profa. Dra. Ana Silvia Prata Soares
(Membro Suplente)

Profa. Dra. Mônica Maria de Oliveira Pinho Cerqueira
(Membro Suplente)

Profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto
(Membro Suplente)

DEDICATÓRIA

*Dedico mais esta conquista a Deus em primeiro lugar,
ao meu esposo Nino
e à minha querida filha Isabele,
por estarem ao meu lado sempre e encherem a minha vida de amor e felicidade.*

*“Não desperdicemos o presente. Ele é o único em que podemos reparar o passado e
construir o futuro”*

Rose Marie Muraro

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar pelos caminhos certos, abençoando e iluminando minha vida.

Ao meu esposo, Nino, por seu amor, apoio, incentivo e paciência, pois sem ele não teria chegado até aqui.

À minha filha, Isabele, a alegria da minha vida, por encher meus dias de amor e forças para continuar.

Aos meus pais, Tônia e Luiz, que me deram a vida e sempre incentivaram a educação e o conhecimento, sendo exemplos de vida.

À minha irmã e amiga, Lívia, por todo o amor, compreensão, ajuda em todos os momentos e por ser um exemplo de profissional. Aos meus irmãos, Jonas e Maiara, pelas experiências vividas, pelo amor, amizade e apoio incondicionais.

Às minhas cunhadas Zenaide e Lílian, e minhas sobrinhas, Renata e Thaianne por todas as horas de apoio e cuidado com minha filha para que eu pudesse me empenhar nesse trabalho.

À minha querida avó, Rose Muraro, por ser a maior incentivadora e inspiradora de minha educação e desenvolvimento como ser humano.

À toda a minha família, Muraro e Tenório, pela paciência, apoio, ajuda e torcida.

À minha orientadora, profa. Mirna Gigante, por ter me dado essa oportunidade, ter confiado no meu trabalho, por toda a paciência, muitos ensinamentos e pelo convívio nessa jornada, que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos membros da banca examinadora pelas correções e sugestões na etapa final deste trabalho.

Ao prof. Carlos Grosso, pela ajuda e paciência na elaboração das microcápsulas.

À Bete, amiga e técnica do laboratório de leite, por toda a ajuda e atenção durante todos os momentos no laboratório e fora dele, e pela ajuda com o português e o inglês.

À Yara, técnica do laboratório de Microscopia de Alimentos, pela fundamental ajuda na produção de microcápsulas e na realização das microscopias.

A Diana e Renata, técnicas do laboratório de Microbiologia e de Instrumentação, pela paciência e ajuda nos momentos de dúvidas e a todos os técnicos e funcionários do DTA e DEPAN pelo apoio.

À Ana Lourdes, pelo apoio essencial e consultorias em microbiologia.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Leite: Veri, Lígia, Mônica, Karina, Cecília, Diogo, Guilherme, Guilherme Tedrus, Laís, Ana Carolina, Gislaine e Carol, pelo carinho, companheirismo e amizade que vou levar para sempre. Também aos ex-companheiros Priscila Vianna, Renata Perez, Priscila Mamede, Marcela, Atílio, Bárbara, Miriam, Sofia, Francisco e Daniel.

Aos alunos de pós-graduação do DTA e DEPAN: Simone, Ana Cláudia, Graciela, Letícia, Marcília, Wellington, Adriano, Vanessa, Carolyne, Flávia, Juliana, Mariana, Izabela, Priscila, Thalita, pela convivência, apoio e troca de experiências.

Às minhas amigas e companheiras de trabalho Karina e Cecília, que foram fundamentais no desenvolvimento desse projeto, me apoiando em todos os momentos, trabalhando junto e resolvendo problemas, rindo ou chorando.

Às amigas Flávia e Juliana, por toda a ajuda com as microcápsulas e bons momentos juntas.

Às queridas estagiárias Bia e Grasiela, por toda a importante ajuda no desenvolvimento do trabalho e também pelo carinho e momentos de alegria.

Às amadas amigas Lumena, Renilda e Maria Luísa, que mesmo de longe sempre me apoiaram e me ajudaram a prosseguir.

À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

À Christian Hansen pelas culturas e informações fornecidas.

À CPKelco pela doação da pectina.

A todos que incentivaram ou contribuíram de alguma forma, para o ingresso, durante a jornada ou para que fosse possível chegar ao fim. Muito obrigada!

RESUMO GERAL

A adição de micro-organismos probióticos em queijos tem sido explorada devido ao potencial desses produtos na proteção aos micro-organismos durante a estocagem e o consumo do produto, o que garante os efeitos benéficos à saúde conferidos pelos probióticos. O processo de microencapsulação é uma alternativa que pode aumentar a proteção dos micro-organismos probióticos adicionados aos produtos. Este estudo teve como objetivo a microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* e sua aplicação em queijo Prato. Primeiramente, foram avaliadas diferentes metodologias para a contagem seletiva de *L. acidophilus*, com o objetivo de selecionar o método mais eficiente para a contagem do probiótico adicionado ao queijo Prato produzido com *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. As metodologias consideradas seletivas, avaliadas tanto em culturas puras como em queijo Prato foram: ágar MRS adicionado de sorbitol incubado a 45°C/72 horas em anaerobiose para contagem de *L. acidophilus* e ágar M17 incubado a 30°C/72 horas em aerobiose para a contagem de *Lactococcus lactis*. Foram produzidas microcápsulas de pectina por gelificação iônica e coacervação complexa, recobertas com proteína de soro tratada ou não termicamente com a finalidade de avaliar o efeito do recobrimento sobre a viabilidade do *L. acidophilus* durante a simulação da passagem pelo trato gastrointestinal. As microcápsulas apresentaram alto teor de umidade, morfologia semelhante e viabilidade do *L. acidophilus* próxima de 8 log UFC/g, indicando que não houve perda de viabilidade durante o processo de microencapsulação. A microencapsulação do *L. acidophilus* conferiu maior proteção ao micro-organismo após exposição a suco gástrico artificial em pH 3,0 quando comparado ao micro-organismo livre. As microcápsulas recobertas com proteína do soro, por sua vez, não conferiram proteção adicional ao micro-organismo quando exposto às mesmas condições. Para a fabricação de queijo Prato probiótico foram escolhidos três tratamentos: 1) adição de *Lactobacillus acidophilus* livre; 2) adição de *L. acidophilus* em microcápsulas de pectina; 3) adição de *L. acidophilus* em microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro tratada termicamente. Os queijos probióticos apresentaram composição típica de queijo Prato tradicional, não havendo diferença entre os tratamentos. Durante 60 dias de armazenamento refrigerado, os queijos apresentaram aumento da proteólise, redução da firmeza, e boa

aceitação e intenção de compra na avaliação sensorial. A população de *L. acidophilus* nos queijos apresentou redução de 1 ciclo logarítmico durante o armazenamento, apresentando contagens com valor inferior ao estabelecido pela legislação brasileira para produtos probióticos. Não houve redução significativa do micro-organismo probiótico durante a exposição dos queijos à simulação da passagem pelo trato gastrointestinal. Os resultados indicam que o queijo Prato é um veículo adequado para a adição de micro-organismos probióticos, porém nas condições avaliadas a microencapsulação do probiótico comercial *Lactobacillus acidophilus* La5 não conferiu proteção adicional ao micro-organismo no queijo.

SUMMARY

The addition of probiotic microorganisms in cheese has been explored due to the potential of these products in protecting the microorganisms during storage and consumption, which ensures the health benefits of probiotics. The microencapsulation process is an alternative to increase protection of probiotics microorganisms added to the products. The aim of this study was the microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and its application in Prato cheese. First, we evaluated different methodologies for the selective count of *L. acidophilus* in order to select the most efficient method for the enumeration of probiotic in Prato cheese produced with *Lactococcus lactis subsp. lactis* and *Lactococcus lactis subsp. cremoris*. The methodologies considered selective both in pure cultures and in Prato cheese were: MRS-sorbitol agar under anaerobic conditions at 45 °C/72 h for enumeration of *L. acidophilus* and M17 agar under aerobic conditions at 30 °C/72 h for enumeration of *Lactococcus lactis*. Microcapsules were obtained by ionotropic gelation and complex coacervation and covered with whey protein (with or without heat treatment) for the purpose of evaluating the effect of coating on the viability of *L. acidophilus* during the simulation of the passage through the gastrointestinal tract. The microcapsules presented high moisture content, similar morphology and 8 log CFU / g viability of *L. acidophilus*, indicating no loss of viability during the microencapsulation process. Microencapsulation of *L. acidophilus* conferred greater microorganism protection after exposure to artificial gastric juice at pH 3.0 when compared to the free microorganism. The whey protein coated microcapsules, in turn, did not provide additional protection for the microorganism when exposed to the same conditions. For the manufacture of the probiotic Prato cheeses the following treatments were studied: 1) addition of free *L. acidophilus*, 2) addition of *L. acidophilus* in pectin microcapsules, 3) addition of *L. acidophilus* in pectin microcapsules coated with heat-treated whey protein. The probiotic cheeses presented typical composition of Prato cheese, with no difference between treatments. During 60 days of refrigerated storage, the cheeses had increased proteolysis, decreased firmness and showed good sensorial acceptance and purchase intention. Population of *L. acidophilus* in the cheeses decreased 1 log cycle during storage, with counts below the limit established by Brazilian legislation for probiotic products. There was no significant reduction of the probiotic microorganism during the

simulation of the passage through the gastrointestinal tract. Although the results indicate the cheese is a suitable vehicle for the addition of probiotic microorganisms, the microencapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* LA5 did not confer additional protection for the microorganism in cheese under the conditions studied.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	5
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
1. PROBIÓTICOS	11
2. <i>Lactobacillus</i> sp.....	12
3. BENEFÍCIOS À SAÚDE.....	13
4. PRODUTOS PROBIÓTICOS	14
5. ENUMERAÇÃO DE PROBIÓTICOS EM PRODUTOS LÁCTEOS	14
6. MICROENCAPSULAÇÃO	21
7. SIMULAÇÃO DA PASSAGEM PELO TRATO GASTROINTESTINAL.....	27
8. QUEIJOS ADICIONADOS DE MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS....	29
9. QUEIJO PRATO	32
10. REFERÊNCIAS.....	34
CAPÍTULO 2 - CONTAGEM SELETIVA DE <i>Lactobacillus acidophilus</i> La5 EM QUEIJO PRATO	49
RESUMO.....	49
1. INTRODUÇÃO.....	50
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
2.1. Meios de cultura	51
2.2. Preparo do inóculo	53
2.3. Fabricação do queijo Prato.....	54
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4. CONCLUSÕES	59
5. REFERENCIAS	59
CAPÍTULO 3 - MICROENCAPSULAÇÃO DE <i>Lactobacillus acidophilus</i> La5 POR DIFERENTES TÉCNICAS.....	63
RESUMO.....	63
1. INTRODUÇÃO.....	64

2.	MATERIAL E MÉTODOS	65
2.1.	Materiais.....	66
2.2.	Preparo do concentrado celular de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La5 utilizado na microencapsulação	66
2.3.	Produção de microcápsulas contendo <i>Lactobacillus acidophilus</i> La5	67
2.4.	Caracterização físico-química e avaliação da viabilidade do probiótico nas microcápsulas recém-produzidas	68
2.4.1.	Composição físico-química	68
2.4.2.	Avaliação da viabilidade de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La5 nas microcápsulas recém-produzidas	69
2.5.	Caracterização físico-química e avaliação da viabilidade do <i>Lactobacillus acidophilus</i> La5 nas microcápsulas expostas a condições gastrointestinais simuladas.....	69
2.5.1.	Preparo do suco gástrico e intestinal artificial e da solução de bile	70
2.5.2.	Caracterização físico-química das micropartículas expostas à simulação das condições gastrointestinais.....	70
2.5.3.	Avaliação da viabilidade do <i>Lactobacillus acidophilus</i> La5 durante simulação das condições gastrointestinais.....	72
2.6.	Delineamento experimental e análise estatística	74
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
3.1.	Caracterização físico-química e avaliação da viabilidade do probiótico nas microcápsulas recém-produzidas	75
3.2.	Caracterização físico-química e avaliação da viabilidade do <i>Lactobacillus acidophilus</i> La5 nas microcápsulas expostas a condições gastrointestinais simuladas.....	78
3.2.1.	Caracterização físico-química	78
3.2.2.	Avaliação da viabilidade do <i>Lactobacillus acidophilus</i> La5 nas microcápsulas expostas a condições gastrointestinais simuladas.....	86
4.	CONCLUSÕES	91
5.	REFERÊNCIAS	92

CAPÍTULO 4 – PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE QUEIJO PRATO ADICIONADO DE <i>Lactobacillus acidophilus</i> La5 LIVRE E MICROENCAPSULADO.....	99
1. INTRODUÇÃO.....	101
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	102
2.1. Preparo das culturas	102
2.2. Produção das microcápsulas contendo <i>Lactobacillus acidophilus</i>	102
2.2.1. Composição físico-química das microcápsulas	103
A caracterização físico-química das microcápsulas recém produzidas foi feita através da avaliação do tamanho médio e da distribuição de tamanho das partículas, morfologia e dos teores de proteína, umidade e lipídeos.....	103
2.2.2. Avaliação da viabilidade de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La5 nas microcápsulas recém produzidas	104
2.3. Fabricação do queijo Prato.....	105
2.3.1. Caracterização físico-química e microbiológica do leite.....	107
2.4. Caracterização físico-química e microbiológica dos queijos.....	108
2.4.1. Análises físico-químicas dos queijos Prato adicionados de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	108
2.4.2. Análises microbiológicas dos queijos Prato adicionado de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	111
2.5. Avaliação da viabilidade do <i>Lactobacillus acidophilus</i> nos queijos durante exposição a condições que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal.....	112
2.5.1. Preparo do suco gástrico e intestinal artificial e da solução de bile ...	112
2.5.2. Avaliação da viabilidade do <i>Lactobacillus acidophilus</i>	113
2.6. Delineamento experimental e análise estatística dos dados	115
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	116
3.1. Caracterização das microcápsulas contendo <i>Lactobacillus acidophilus</i>	116
3.2. Fabricação do queijo Prato adicionado de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La5....	119
3.2.1. Caracterização da matéria-prima	119
3.2.2. Caracterização físico-química e microbiológica dos queijos	120

3.2.3. Efeito dos tratamentos e do tempo sobre as características de maturação do queijo Prato.....	122
3.2.4. Análises microbiológicas dos queijos.....	132
3.3. Avaliação da viabilidade do <i>Lactobacillus acidophilus</i> nos queijos durante exposição a condições que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal.....	134
3.4. Avaliação sensorial dos queijos adicionados de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La5	136
4. CONCLUSÕES	139
5. REFERÊNCIAS	139
CONCLUSÃO GERAL	145
ANEXO 1	146
ANEXO 2	147

INTRODUÇÃO GERAL

Probióticos são micro-organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). Diversos micro-organismos podem ser considerados potencialmente probióticos, entretanto, as cepas mais importantes comercialmente são as de bactérias ácido lácticas e as bifidobacterias (SHAH, 2007; VASILJEVIC e SHAH, 2008; MARGOLLES et al., 2009).

Uma vez adicionadas, as culturas probióticas com bom desempenho tecnológico devem permanecer viáveis e estáveis e não alterarem as características sensoriais típicas do produto nas condições de processamento e durante toda a sua vida de prateleira (FULLER, 1989; KAILASAPATHY e CHIN, 2000; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2002; PICOT e LACROIX, 2003; FRANZ et al., 2011). Entretanto, a viabilidade dos probióticos é afetada por diversos fatores, principalmente pelas condições encontradas durante a passagem pelo trato gastrointestinal (ROSS et al., 2002; BURGAIN et al., 2011). Diante disso, a microencapsulação é uma tecnologia que tem sido utilizada para aumentar a viabilidade dos probióticos desde o processamento até o consumo dos produtos aos quais foram adicionados, a fim de garantir seus efeitos benéficos à saúde do consumidor.

Os probióticos têm sido adicionados em diferentes produtos, sendo os produtos lácteos os mais utilizados, uma vez que são considerados sistemas ideais para a veiculação de micro-organismos probióticos para o trato gastrointestinal, por contribuírem na manutenção de sua viabilidade (ROSS et al., 2002). Dentre os produtos lácteos, os queijos apresentam bom potencial para veiculação de micro-organismos probióticos devido a suas características físico-químicas, como alto teor de proteínas e gorduras, que mantêm a estabilidade do micro-organismo durante a estocagem e o consumo do produto (KARIMI et al., 2011). Frente a este potencial, a produção de queijos com adição de probióticos microencapsulados pode melhorar a estabilidade dos micro-organismos.

A adição de micro-organismos probióticos nas formas livre e microencapsulada em queijos tem sido estudada por diversos autores (DINAKAR e MISTRY, 1994; GOBBETTI et al., 1998; GARDINER et al., 2002; ÖZER et al., 2008, 2009;

ZOMORODI et al., 2011) que, em geral, observam que a microencapsulação confere proteção aos micro-organismos quando expostos a condições adversas.

O *L. acidophilus* é um dos micro-organismos probióticos mais utilizados em produtos comerciais e em pesquisas, por ter seus efeitos benéficos comprovados e estabelecidos, além de não apresentar alta sensibilidade ao oxigênio. Tendo em vista os benefícios apresentados pelos queijos para a veiculação de probióticos e diante do fato do queijo Prato ser um queijo amplamente consumido no Brasil, a produção de queijo Prato probiótico, com adição de cultura comercial na forma livre ou microencapsulada, pode gerar um produto de alto valor agregado, sendo considerado um alimento funcional. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi a produção e avaliação de queijo Prato adicionado de *Lactobacillus acidophilus* La5 livre ou microencapsulado.

O trabalho foi dividido em quatro capítulos. No primeiro capítulo, apresenta-se uma revisão bibliográfica sobre os principais temas abordados: os micro-organismos probióticos, com suas características e sua contagem seletiva em produtos lácteos; a microencapsulação aplicada a micro-organismos probióticos e a aplicação desses micro-organismos aos queijos, tanto na forma livre, quanto na forma microencapsulada. Devido às dificuldades encontradas em testes preliminares, no segundo capítulo está apresentada a avaliação de diferentes metodologias utilizadas para a contagem seletiva de *Lactobacillus acidophilus* La5 em presença de lactococos, com o objetivo de selecionar uma metodologia eficiente para a avaliação da viabilidade de *L. acidophilus* em queijo probiótico. No terceiro capítulo, avaliou-se se o recobrimento de microcápsulas de pectina contendo *Lactobacillus acidophilus*, com proteína de soro tratada ou não termicamente, afeta a viabilidade do probiótico quando exposto às condições que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal. O quarto capítulo apresenta os resultados da avaliação das características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de queijo Prato adicionado de *L. acidophilus* La5 livre e em dois tipos de microcápsulas durante 60 dias de armazenamento refrigerado.

REFERÊNCIAS

BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 467-483, 2011.

DINAKAR, P.; MISTRY, V. V. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2854-2864, 1994.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. 34 p. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf.

FRANZ, C. M. A. P.; CHO, G. S.; HOLZAPFEL, W. H. Probiotics: taxonomy and technological features. In: SHAH, N.P.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. (Ed.). **Probiotic and Prebiotic Foods: Technology, Stability and Benefits to Human Health**. 1ª Ed. Nova Science Publishers, Inc., New York, 2011, 545 p.

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

GARDINER, G. E.; BOUCHIER, P.; O'SULLIVAN, E.; KELLY, J.; COLLINS, J. K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R. P.; STANTON, C. A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 749-756, 2002.

GOBBETTI, M.; CORSETTI, A.; SMACCHI, E. ZOCCHETTI, A.; ANGELIS, M. Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 37-47, 1998.

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.

KARIMI, R.; MORTAZAVIAN, A. M.; DA CRUZ, A. G. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. **Dairy Science and Technology**, v. 91, p. 283-308, 2011.

MARGOLLES, A.; MAYO, B.; RUAS-MADIEDO, P. Screening, identification, and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. In: LEE, W. K.; SALMINEN, S. (Ed.). **Handbook of probiotics and prebiotics** – 2ª ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2009. 506 p.

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

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 01, p. 1-21, 2002.

ÖZER, B.; UZUN, Y. S.; KIRMACI, H. A. Effect of microencapsulation on viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 during Kasar cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v. 61, n. 3, p. 237-244, 2008.

ÖZER, B.; KIRMACI, H. A.; SENEL, E.; ATAMER, M.; HAYALOGLU, A. Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 22-29, 2009.

PICOT, A.; LACROIX, C. Effects of micronization on viability and thermotolerance of probiotic freeze-dried cultures. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 455-462, 2003.

ROSS, R. P.; FITZGERALD, G.; COLLINS, K.; STANTON, C. Cheese delivering biocultures – probiotic cheese. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2, p. 71-78, 2002.

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

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

ZOMORODI, S.; KHOSROSHAHI, A.; ROHANI, S., M. R.; MIRAGHAEI, S. Survival of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium bifidum* in free and microencapsulated forms on Iranian white cheese produced by ultrafiltration. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 1, p. 84-91, 2011.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. PROBIÓTICOS

Para serem considerados probióticos, os micro-organismos devem ser adequadamente selecionados, através de um processo complexo, e para tanto alguns requisitos básicos de segurança devem ser considerados: 1) a origem, que deve ser o trato gastrointestinal saudável, 2) a não patogenicidade e toxicidade e 3) a resistência a antimicrobianos (FULLER, 1989; KAILASAPATHY e CHIN, 2000; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; MARGOLLES et al., 2009). As cepas probióticas selecionadas devem ser tolerantes ao suco gástrico e aos sais biliares para chegarem a concentração suficiente no intestino, onde devem apresentar capacidade de aderência e colonização nas superfícies epiteliais (FULLER, 1989; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; FRANZ et al., 2011).

De acordo com as diretrizes para avaliação de probióticos em alimentos, (FAO/WHO, 2006), a identificação desses micro-organismos deve ser realizada através de uma combinação de técnicas fenotípicas e genéticas, para se atribuir corretamente seus efeitos benéficos, considerando que os efeitos dos probióticos são espécie-específicos. Testes *in vitro* são úteis para o conhecimento dos mecanismos relacionados ao efeito probiótico das cepas e podem ser correlacionados com estudos *in vivo* em modelos animais. Entretanto, os probióticos para uso humano devem ser validados em estudos com humanos, considerando-se aspectos de segurança e eficácia. Para isso, devem ser realizados testes duplo cego randomizados controlados por placebo, os quais permitem avaliar a eficácia da cepa probiótica e também determinar possíveis efeitos adversos (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; FAO/WHO, 2006; MARGOLLES et al., 2009).

Desde 2008, os micro-organismos permitidos como probióticos no Brasil pela ANVISA (BRASIL, 2008) são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium*

animalis (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium*.

2. *Lactobacillus* sp.

Os lactobacilos são ubíquos na natureza, encontrados em meios ricos em carboidratos. São bacilos de 0,5 a 1,2 x 1,0 a 10,0 µm, Gram-positivos, imóveis, não formadores de esporos e catalase negativo, com algumas exceções. São homofermentativos obrigatórios em sua maioria, mas podem ser heterofermentativos. São exigentes nutricionalmente em relação a carboidratos, aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, sais, ácidos nucleicos e vitaminas. Grande quantidade de ácido láctico e pequenas quantidades de outros compostos são produzidas por seu metabolismo. Mais de 100 espécies do gênero *Lactobacillus* já foram identificadas. São anaeróbios facultativos e às vezes microaerófilos. Sua temperatura de crescimento está entre 35 e 45°C, não havendo crescimento abaixo de 15°C, e seu pH ótimo é de 5,5 a 6,0 (FULLER, 1989, TAMIME e ROBINSON, 1999, BERGEY'S, 2000; VASILJEVIC e SHAH, 2008; HAMMES e HERTEL, 2006).

Dentre as espécies de lactobacilos, o *L. acidophilus* é uma das mais pesquisadas e empregadas como probiótico em alimentos, principalmente em produtos lácteos. O *Lactobacillus acidophilus* tem uma temperatura ótima de crescimento entre 35 e 40°C, mas pode crescer até 45°C. O pH ótimo de crescimento encontra-se entre 5,5 e 6,0 e sua tolerância à acidez varia de 0,3% a 1,9%. Apresenta dimensões de 0,6 a 0,9 por 1,5 a 6 µm, ocorrendo sozinho, em pares ou cadeias curtas (IDF, 1995; KLAENHAMMER, 1998; GOMES e MALCATA, 1999; HAMMES e HERTEL, 2006). Fermenta os seguintes carboidratos: amidalina, celobiose, galactose, lactose, maltose, manose, salicina, sacarose e trealose, podendo fermentar também melibiose, rafinose, arabinose, ribose, frutose, manitol, sorbitol e esculina (CHARTERIS et al., 2001; HAMMES e HERTEL, 2006).

3. BENEFÍCIOS À SAÚDE

Diversos benefícios à saúde têm sido atribuídos aos produtos contendo micro-organismos probióticos. Enquanto alguns desses benefícios são bem documentados e estabelecidos, outros têm mostrado potencial em modelos animais, ainda necessitando de pesquisas com humanos. Entretanto, os benefícios são específicos de cada cepa, não havendo uma cepa que possua todos os efeitos benéficos já descritos (VASILJEVIC e SHAH, 2008). Tais benefícios são relatados por diversos autores (LEE e SALMINEM, 1995; CHARTERIS et al., 1998; KAILASAPATHY e CHIN, 2000; FAO, 2001; TUOHY et al., 2003; VASILJEVIC e SHAH, 2008) e incluem: aumento da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos e estimulação do sistema imune; promoção da digestão da lactose em indivíduos com intolerância; aumento da absorção de minerais; alívio da constipação; redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori*; diminuição do risco associado à carcinogenicidade e de doença cardiovascular; efeitos anti-hipertensivos e hipocolesterolêmicos e tratamento e prevenção de alergias e de infecções urogenitais. O reconhecimento desses benefícios contribuiu de maneira significativa para o rápido crescimento e expansão de produtos e suplementos de dietas baseados em probióticos (STANTON et al., 1998; KAILASAPATHY, 2002; O'FLAHERTY e KLAENHAMMER, 2010).

No Brasil, a Comissão de Assessoramento Técnico-científico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, instituída junto à Câmara Técnica de Alimentos (BRASIL, 1999) estabeleceu que a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na porção recomendada do produto pronto para o consumo (BRASIL, 2008). Segundo Vasiljevic e Shah (2008), a sugestão desses níveis é feita para compensar o possível declínio na população do micro-organismo durante o processamento, estocagem e consumo do produto probiótico, já que sua viabilidade é um dos pré-requisitos para uma série de efeitos benéficos à saúde. Neste contexto, técnicas de enumeração adequadas dos micro-organismos probióticos nos alimentos são fundamentais para o controle da quantidade de micro-organismos ingeridos.

4. PRODUTOS PROBIÓTICOS

Os produtos lácteos são tradicionalmente utilizados para veicular micro-organismos probióticos, principalmente os fermentados como o iogurte (DAVE e SHAH, 1997; SHAH e LANKAPUTHRA, 1997; DONKOR et al, 2006, 2007). Entretanto outros produtos têm sido estudados, como por exemplo, sobremesas lácteas fermentadas (SHAH e RAVULA, 2000), leite acidificado (GROSSO e FÁVARO-TRINDADE, 2004; TABASCO et al., 2007), sorvete (HEKMAT e MCMAHON, 1992; HOMAYOUNI et al., 2008; AKALIN e ERISIR, 2008; DI CRISCIO et al., 2010), mousse de chocolate (ARAGON-ALEGRO et al., 2007) e diferentes tipos de queijos (ROY et al., 1997; GOMES et al., 1998; VINDEROLA et al., 2000; MCBREARTY et al., 2001; KASIMOGLU et al., 2004; MARUYAMA et al., 2006; PHILIPS et al., 2006; ONG et al, 2006, 2007; ÖZER et al., 2008, 2009; BERGAMINI et al., 2005, 2009; BURITI et al., 2005a,b, 2007; DARUKARADHYA et al., 2006; SOUZA et al., 2008, 2009; RIBEIRO et al., 2009; ONG et al., 2009; FORTIN et al., 2011; SCHELLER e O'SULLIVAN, 2011; OBERG et al., 2011).

Embora os leites fermentados, especialmente o iogurte, sejam os principais veículos dos micro-organismos probióticos, os queijos apresentam vantagens em relação aos leites fermentados na manutenção da viabilidade desses micro-organismos (STANTON et al., 1998; SHAH, 2007; ÖZER et al., 2008; KARIMI et al., 2011). A matriz proteica formada no processo de fabricação de queijos por coagulação enzimática proporciona proteção adicional aos probióticos sensíveis à acidez, tanto no produto como no trato gastrointestinal (VINDEROLA et al., 2002).

5. ENUMERAÇÃO DE PROBIÓTICOS EM PRODUTOS LÁCTEOS

A viabilidade dos micro-organismos probióticos no produto final é um dos critérios de qualidade mais importantes, e deve manter-se alta (no mínimo 10^7 UFC/g) até o fim de sua vida útil (VASILJEVIC e SHAH, 2008; LAHTINEN et al., 2011). Por isso, técnicas de enumeração eficientes são necessárias para verificar a viabilidade dos micro-organismos probióticos nos produtos, para garantir que estejam presentes nas quantidades mínimas exigidas pela legislação, e assim exerçam seus efeitos benéficos à

saúde dos consumidores (SHAH, 2000; VASILJEVIC e SHAH, 2008; LAHTINEN et al., 2011).

Tradicionalmente, a enumeração de micro-organismos em alimentos tem sido realizada por contagem em placas. Nesse método, a amostra é homogeneizada em tampão, meio nutriente ou solução salina e as diluições apropriadas são plaqueadas em meio base ou seletivo suplementado com ágar. Os dois métodos padrões para o preparo das placas são o plaqueamento em superfície (*spread plate*) e em profundidade (*pour plate*). As contagens de micro-organismos são determinadas após a incubação em condições adequadas, por enumeração de colônias, e o resultado é expresso como unidades formadoras de colônias (UFC) (ASHRAF e SHAH, 2011; LAHTINEN et al., 2011).

Diversos meios para enumeração de micro-organismos probióticos têm sido propostos, porém a maioria é baseada em culturas puras desses micro-organismos. A enumeração de uma única cepa usando um meio seletivo é facilmente realizada. Entretanto, os micro-organismos probióticos são frequentemente incorporados em alimentos em combinação com outras bactérias ácido-láticas, o que cria um desafio na enumeração específica dos micro-organismos por métodos tradicionais (THARMARAJ e SHAH, 2003; ASHRAF e SHAH, 2011; LAHTINEN et al., 2011).

Para a contagem de micro-organismos probióticos em alimentos, meios diferenciais e seletivos têm sido empregados. Meios diferenciais permitem o crescimento de diferentes micro-organismos, sendo possível realizar a diferenciação do micro-organismo de interesse, com sua contagem, pela morfologia das colônias. Os meios seletivos favorecem o crescimento do micro-organismo de interesse, inibindo o crescimento de outros micro-organismos, uma vez que consideram suas características metabólicas específicas e assim, todas as colônias contadas nas placas são consideradas como o micro-organismo de interesse. Para tal propósito é utilizada a adição de compostos inibitórios (como antibióticos ou metais pesados), variações químicas dos meios (por exemplo, pH) ou condições de incubação (temperatura e níveis de oxigênio). É importante lembrar que o uso desse tipo de meio pode limitar o crescimento e a recuperação de células metabolicamente injuriadas devido à presença de agentes

seletivos, o que pode subestimar a população real de micro-organismos presentes. Porém, o uso de meios seletivos permite a contagem direta de colônias em placas sem necessidade de análise complementar, sendo de fácil execução (LAHTINEN et al., 2011; OBERG et al., 2011).

Do ponto de vista prático, a enumeração diferencial de micro-organismos probióticos e culturas lácticas em alimentos não é simples, devido à presença de vários micro-organismos com condições de crescimento e características metabólicas similares. A observação fenotípica pode nem sempre ser estável e a identificação da colônia é subjetiva. Portanto, para uma enumeração mais conclusiva do micro-organismo probiótico, um meio especificamente seletivo deve ser desenvolvido para espécies ou grupos (THARMARAJ e SHAH, 2003; VAN DE CASTEELE et al., 2006; ASHRAF e SHAH, 2011; LAHTINEN et al., 2011; KARIMI et al., 2012).

Dentre uma variedade de meios desenvolvidos, poucos foram validados em estudos comparativos para a enumeração de probióticos, principalmente em produtos lácteos, com adequada quantificação, recuperação e diferenciação de outros micro-organismos presentes no produto (THARMARAJ e SHAH, 2003). O Quadro 1 apresenta diferentes meios de cultura indicados como seletivos para a contagem de *Lactobacillus acidophilus* a partir de estudos com culturas puras e o Quadro 2 apresenta a utilização de diversos meios de cultura seletivos para a enumeração de *L. acidophilus* em queijos.

Quadro 1 - Meios seletivos para contagem de *Lactobacillus acidophilus* a partir de análises com culturas puras

Meio	Aditivos	Condições de incubação	Outros micro-organismos presentes	Referências
Ágar MRS	-	43°C, 72 horas, anaerobiose	<i>Lactococcus lactis</i>	IDF (1995)
Ágar MRS sorbitol	Sorbitol	37°C, 72 horas, anaerobiose	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> e <i>Bifidobacterium</i> sp.	Dave e Shah (1996)
Ágar MRS bile	Bile	37°C, 72 horas, anaerobiose	<i>B. bifidum</i> , <i>S. thermophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i>	Vinderola e Reinheimer (1999)
Ágar sorbitol	Sorbitol	37°C, 72 horas, anaerobiose	<i>L. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , Bifidobacteria e Propionibacteria	Tharmaraj e Shah (2003)
Ágar maltose	Maltose	37°C, 72 horas, anaerobiose	<i>L. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , Bifidobacteria e Propionibacteria	Tharmaraj e Shah (2003)
Ágar MRS clindamicina	Clindamicina	37°C, 24-72 horas, anaerobiose	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>Lactococcus</i> <i>lactis</i> e <i>Leuconostoc</i> sp.	Van de Castele et al. (2006)
Ágar MRS bile	Bile	37°C, 72 horas, aerobiose	Bifidobacteria, <i>L. casei</i> , <i>S. thermophilus</i> , e <i>L. bulgaricus</i>	Mortazavian et al. (2007)

Fonte: Diversos autores

Quadro 2 - Meios de cultura utilizados para contagem seletiva de *Lactobacillus acidophilus* em queijos, fabricados com adição de cultura de *Lactococcus* sp.

Meio	Aditivos	Condições de incubação	Outros micro-organismos presentes	Tipo de queijo	Referências
Ágar MRS bile	Bile	37°C, 72 horas, aerobiose	<i>Lactococcus lactis</i> , Bifidobacteria, <i>L. casei</i> , <i>S. thermophilus</i>	Queijo fresco argentino	Vinderola et al. (2000)
Ágar MRS	Ágar MRS acidificado (pH 5,4)	37°C, 72 horas, anaerobiose	<i>Lactococcus lactis lactis</i> e <i>L. lactis cremoris</i>	Queijo branco turco	Kasimoglu et al. (2004)
Ágar MRS maltose	Maltose	43°C, 72 horas, anaerobiose	<i>Lactococcus lactis lactis</i> e <i>L. lactis cremoris</i>	Queijo Minas Frescal	Buriti et al. (2005a)
Ágar MRS-BC	Ágar MRS com verde de bromocresol e clindamicina	37°C, 48 horas, anaerobiose	<i>Lactococcus lactis lactis</i> e <i>L. lactis cremoris</i> , <i>B. lactis</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>Bifidobacterium</i> sp.	Queijo Cheddar	Phillips et al. (2006)
Ágar MRS sorbitol	Sorbitol	37°C, 72 horas, aerobiose	<i>Lactococcus lactis lactis</i> e <i>L. lactis cremoris</i> , <i>L. casei</i> , <i>B. longum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>B. lactis</i>	Queijo Cheddar	Ong et al. (2006)
RCABC	RCA com verde de bromocresol e clindamicina	37°C, 48 horas, anaerobiose	<i>Lactococcus lactis lactis</i> e <i>L. lactis cremoris</i> , <i>B. lactis</i>	Queijo Cheddar	Darukaradhya et al. (2006)
Ágar MRS maltose	Maltose	37°C, 72 horas, aerobiose	<i>Lactococcus lactis lactis</i> e <i>L. lactis cremoris</i>	Queijo Minas Frescal	Buriti et al. (2007)
Ágar MRS Sorbitol	Sorbitol	37°C, 72 horas, anaerobiose	<i>Lactococcus lactis lactis</i> e <i>L. lactis cremoris</i> ,	Queijo Kasar	Özer et al. (2008, 2009)
Ágar MRS sorbitol	Sorbitol	37°C, 72 horas, anaerobiose	<i>Lactococcus lactis lactis</i> e <i>L. lactis cremoris</i>	Queijo Cheddar	Ong e Shah (2009)
Ágar MRSS	Sorbitol	45°C, 72 horas, anaerobiose	<i>Lactococcus</i> , <i>L. casei</i> , <i>Bifidobacterium</i> sp.	Queijo Cheddar	Oberg et al. (2011)

Fonte: Diversos autores

Dentre as metodologias para a contagem seletiva de *Lactobacillus acidophilus*, o ágar MRS adicionado de bile, incubado a 37°C por 72 horas em aerobiose foi descrito pelo IDF (1995) para contagem seletiva desse micro-organismo em presença de culturas de iogurte (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*) e de bifidobactérias. A eficiência desse meio também foi considerada por Vinderola e Reinheimer (1999),

que avaliaram 15 meios de cultura para a contagem seletiva de *L. acidophilus* e *B. bifidum* em presença de culturas de iogurte e concluíram que o ágar MRS adicionado de bile foi seletivo para a contagem de *L. acidophilus* em produtos lácteos fermentados. O mesmo grupo de pesquisa utilizou posteriormente ágar MRS adicionado de bile, nas mesmas condições de incubação, para a contagem seletiva de *L. acidophilus* em queijo fresco argentino produzido com adição de *Lactococcus lactis* e *B. bifidum* e obtiveram altas contagens nos queijos (em torno de 8 log UFC/g) (VINDEROLA et al., 2000).

O *Lactobacillus acidophilus* La5 (Christian Hansen) é uma das cepas probióticas mais estudadas, com aplicação em diferentes produtos lácteos. Para a sua contagem seletiva em presença de culturas mesofílicas, o laboratório que comercializa a cepa recomenda a utilização de ágar MRS adicionado de clindamicina, com incubação a 37°C em anaerobiose (CHRISTIAN HANSEN, 2007). Da mesma forma, Van de Castele et al. (2006), a partir de análise de culturas puras, consideraram o ágar MRS adicionado de clindamicina eficiente para a contagem seletiva de *L. acidophilus* em queijos, uma vez que nesse meio, o micro-organismo probiótico se desenvolveu, enquanto que, não houve desenvolvimento do fermento láctico do queijo (constituída de *Lactococcus lactis* e *Leuconostoc* sp.). Segundo IDF (2010) o ágar MRS adicionado de clindamicina e ciprofloxacina é considerado adequado para contagem de *L. acidophilus* em fermento láctico.

Outros meios de cultura foram considerados seletivos para a contagem de *Lactobacillus acidophilus*, baseados em experimentos realizados com culturas puras, como no estudo de Dave e Shah (1996), onde foram avaliados 15 meios de cultura para a contagem seletiva de diferentes micro-organismos: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* e bifidobactérias. Para a contagem de *L. acidophilus*, o meio considerado seletivo na presença das culturas testadas foi o ágar MRS adicionado de sorbitol, incubado a 37°C por 72 horas em anaerobiose. Embora no referido estudo não tenha sido feita menção da efetividade do ágar MRS adicionado de sorbitol na seleção de *L. acidophilus* em queijos, o mesmo grupo de pesquisadores desenvolveu estudos posteriores utilizando esse meio para a contagem seletiva de *L. acidophilus* em queijo Cheddar, fabricado com adição de *Lactococcus lactis* (ONG et al., 2006; ONG e SHAH, 2009). Outro grupo de pesquisadores também

utilizou a mesma metodologia para a contagem seletiva de *Lactobacillus acidophilus* em queijo turco salgado com adição de *Lactococcus lactis* (ÖZER et al., 2008, 2009). Em todos os trabalhos acima citados, os queijos probióticos obtiveram altas contagens (em torno de 8 log UFC/g) de *Lactobacillus acidophilus*.

Em estudo recente realizado por Oberg et al. (2011), foram produzidos queijos Cheddar com adição de diferentes micro-organismos probióticos, utilizados como culturas adjuntas (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *Bifidobacterium lactis*), além do fermento láctico de *Lactococcus*. Os queijos foram analisados por seis meios de cultura seletivos para a enumeração dos probióticos e do fermento láctico. O ágar MRS com adição de sorbitol incubado a 37°C, em anaerobiose, foi utilizado para a contagem de bactérias lácticas totais, uma vez que foi considerado um meio de cultura não exclusivo, pois houve desenvolvimento de todas as culturas testadas. Para a contagem seletiva de *Lactobacillus acidophilus*, o ágar MRS com sorbitol como única fonte de carboidrato, incubado a 45°C por 72 horas em anaerobiose, foi considerado eficiente, uma vez que o fermento láctico de *Lactococcus* não se desenvolveu nessa condição.

Os micro-organismos do fermento láctico do queijo, geralmente composto de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*, também são contados seletivamente quando em presença de micro-organismos probióticos. Na literatura há a descrição do ágar M17 adicionado de lactose e incubado a 30°C para a contagem dos lactococos (TERZAGHI e SANDINE, 1975), cujo meio tem sido o mais utilizado para a contagem seletiva destes micro-organismos em presença de *Lactobacillus acidophilus* (VAN DE CASTEELE et al., 2006; DARUKARADHYA et al., 2006, ONG et al., 2006; ONG e SHAH, 2008, 2009; OBERG et al., 2011). Kasimoglu et al. (2004) utilizaram ágar M17 incubado a 37°C para a contagem seletiva de lactococos em queijo branco turco adicionado de *Lactobacillus acidophilus*.

Embora diversas condições reportadas na literatura tenham apresentado bons resultados para a contagem seletiva sendo consideradas eficientes, a eficiência é dependente de algumas variáveis como a cepa utilizada, a presença de outras culturas no produto e o tipo de produto ao qual os probióticos serão adicionados. Para a escolha da metodologia seletiva a ser utilizada no produto lácteo probiótico, é importante testar

diferentes situações que apresentaram resultados positivos em outros estudos, com o objetivo de selecionar a condição mais efetiva na enumeração de micro-organismos probióticos.

A escolha de uma metodologia inadequada pode resultar em uma avaliação errônea a respeito da viabilidade dos micro-organismos presentes nos produtos, podendo superestimar ou subestimar sua população. Todavia, a viabilidade dos probióticos em produtos lácteos é afetada por outros fatores, como o pH, a presença de oxigênio, a compatibilidade com culturas lácticas, bem como pela produção de peróxido de hidrogênio por essas culturas (SHAH et al., 1995; DAVE e SHAH, 1997; SHAH, 2000). A viabilidade desses micro-organismos também é afetada pelas condições encontradas durante a passagem pelo trato gastrointestinal, que se consitem o principal desafio à efetividade dos probióticos (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; FRANZ et al., 2011).

Diante disso, algumas alternativas podem ser utilizadas para melhorar a viabilidade dos probióticos nos produtos aos quais foram adicionados e, principalmente, durante seu consumo. A microencapsulação é uma das alternativas mais promissoras e tem sido amplamente estudada.

6. MICROENCAPSULAÇÃO

Os micro-organismos probióticos podem ser microencapsulados por métodos físicos, químicos e físico-químicos, utilizando-se como materiais de parede, polissacarídeos, celulose, lipídios e proteínas (SHAHIDI e HAN, 1993; GIBBS et al., 1999). Algumas técnicas disponíveis, tais como secagem por atomização ou envolvimento lipossômico, podem não ser adequadas para a microencapsulação de probióticos, pois requerem o emprego de altas temperaturas ou solventes orgânicos, o que pode ser prejudicial aos micro-organismos (LAMBERT et al., 2008). Outras técnicas, como a gelificação iônica e a coacervação complexa, que podem ser conduzidas em condições mais brandas, podem garantir maior sobrevivência dos micro-organismos durante a microencapsulação.

A gelificação iônica é baseada na capacidade de polissacarídeos negativamente carregados, como pectina, alginato, goma carragena e goma gelana de formar gel na presença de íons como o cálcio (BUREY et al., 2008; SMRDEL et al., 2008). As interações dos íons, como o Ca^{2+} , com os grupos carboxílicos dos polissacarídeos resultam na formação de géis insolúveis. A partir do gotejamento do polissacarídeo com o material a ser encapsulado em uma solução de íons há a formação das micropartículas. O contato das gotas com os íons resulta na formação instantânea de estruturas esféricas contendo o material a ser encapsulado disperso uniformemente pela matriz de polissacarídeo (SMRDEL et al., 2008; BUREY et al., 2008), conforme mostrado na Figura 1. Esse gotejamento é feito através de um bico atomizador com alta pressão, e o tamanho das gotas e conseqüentemente das micropartículas depende do diâmetro do bico atomizador, da taxa de fluxo e da viscosidade da solução (BUREY et al., 2008; BURGAIN et al., 2011).

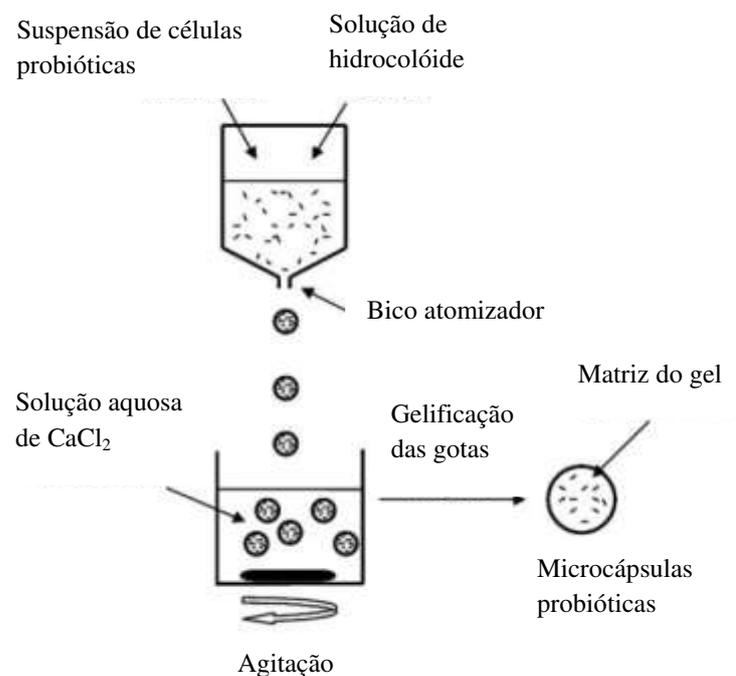


Figura 1: Representação esquemática da microencapsulação de probióticos por técnica de gelificação iônica.

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

Na coacervação complexa, a formação dos complexos de biopolímeros deve-se principalmente às interações eletrostáticas que dependem do grau de ionização dos mesmos e, portanto do pH. Essa técnica é baseada na formação de complexos entre polímeros de cargas opostas, geralmente proteínas e polissacarídeos (WEINBRECK et al., 2004ab). Em valores de pH abaixo do ponto isoelétrico, as proteínas possuem cargas positivas e podem interagir com polissacarídeos de carga negativa, por interação eletrostática com os grupos carboxílicos, por exemplo. A coacervação depende da carga líquida do sistema, sendo conseqüentemente influenciada por parâmetros estruturais dos biopolímeros e pelas condições do meio como pH, força iônica, temperatura e natureza dos reagentes (WEINBRECK et al., 2003; PRATA, 2006).

A escolha do agente encapsulante depende de vários fatores, como a não reatividade com o material que será encapsulado, o processo utilizado para a microencapsulação e o mecanismo de liberação ideal. O tamanho das microcápsulas pode variar de alguns poucos nanômetros até vários micrômetros; a forma dessas microcápsulas também é variável em função do método e do agente encapsulante utilizados para prepará-las (FÁVARO-TRINDADE et al., 2008).

O material encapsulante mais utilizado é o alginato (de cálcio ou de sódio) uma vez que ele não é tóxico e é disponível a baixo custo (LISERRE et al., 2007). *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. têm sido microencapsulados em alginato por técnica de emulsão (SHAH e RAVULA, 2000; HANSEN et al., 2002; DING e SHAH, 2007) e gelificação iônica (FÁVARO-TRINDADE e GROSSO, 2000; CHANDRAMOULI et al., 2004; KAILASAPATHY e SUREETA, 2004; MANDAL et al., 2006).

Entretanto, outros materiais também têm sido utilizados na microencapsulação de probióticos, tais como κ -carragena (ADHIKARI et al., 2003), acetato fitalato de celulose (FAVARO-TRINDADE e GROSSO, 2002), gelatina (HSIAO et al, 2004; ANNAN et al, 2008), pectina e caseína (OLIVEIRA et al., 2007a,b) e proteínas do soro (PICOT e LACROIX, 2004; KAILASAPATHY e SUREETA, 2004; DOHERTY et al., 2010, 2011). Esses materiais têm sido usados para a microencapsulação de bactérias probióticas através de secagem por atomização (FAVARO-TRINDADE e GROSSO,

2002; HSIAO et al, 2004; PICOT e LACROIX, 2004), gelificação iônica (KAILASAPATHY e SUREETA, 2004), emulsão (ADHIKARI et al., 2003; ANNAN et al, 2008) e combinação de métodos como coacervação complexa ou emulsão seguidas de secagem por atomização (OLIVEIRA et al., 2007a.; PICOT e LACROIX, 2004).

A pectina é um polissacarídeo que possui grande quantidade de ácido galacturônico, e também açúcares neutros como a ramnose. As pectinas são classificadas de acordo com o grau de esterificação, que pode variar dependendo da fonte e das condições de obtenção da pectina em: 1) baixo grau de esterificação (25 a 50%) e 2) alto grau de esterificação (50 a 80%), formando géis de diferentes tipos, que são chamados de géis de cálcio e géis ácidos, respectivamente. Nas pectinas de baixo grau de esterificação, o gel é formado na presença de Ca^{2+} que age como uma ponte entre grupos carboxílicos das moléculas de pectina. Esse tipo de pectina é quimicamente mais estável à umidade e ao calor do que a de alto grau de esterificação (AXELOS, 1991; THAKUR et al., 1997; LIU et al., 2003). A interação entre os grupos carboxílicos das moléculas de pectina e os íons cálcio é conhecida como "caixa de ovos" (AXELOS, 1991; LIU et al., 2003), e é apresentada na Figura 2.

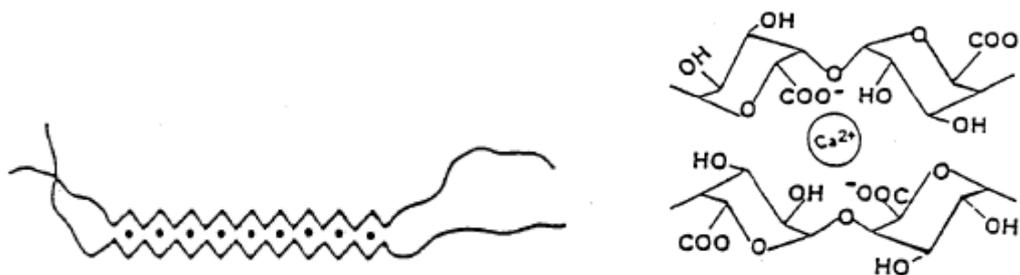


Figura 2: Representação esquemática das ligações entre os grupos carboxílicos das moléculas de pectina e os íons cálcio, conhecidas como "caixa de ovos", onde as cadeias poliméricas seriam as moléculas de pectina (caixa de ovos) e os pontos os íons cálcio (ovos).

Fonte: Axelos (1991)

A gelificação da pectina é afetada por fatores intrínsecos e extrínsecos, que incluem o grau de esterificação, a distribuição de cargas das moléculas, peso molecular, força iônica, pH e temperatura (THAKUR et al., 1997; LIU et al., 2003). A pectina é resistente a proteases e amilases ativas no trato gastrointestinal superior, enquanto é digerida pela microbiota presente no cólon, que consiste predominantemente de micro-organismos anaeróbios, que fermentam substâncias que não são digeridas no intestino delgado, como os polissacarídeos (LIU et al., 2003).

A liberação completa do micro-organismo probiótico das microcápsulas deve ser garantida, para que seja possível sua colonização no intestino, o que é um requisito importante para que esses micro-organismos exerçam seus efeitos benéficos à saúde (HEIDEBACH et al., 2012). Esta liberação pode ser realizada através de diferentes vias, como alteração do pH ou da temperatura do meio, estresse mecânico, atividade enzimática, tempo e força osmótica (ANAL e SINGH, 2007).

A utilização de proteínas na microencapsulação de micro-organismos probióticos tem sido crescentemente explorada devido a sua compatibilidade com a maioria das matrizes alimentícias, sua capacidade de formar microcápsulas por diferentes técnicas e sua digestibilidade, que é importante para a liberação dos probióticos no trato intestinal (HEIDEBACH et al., 2012). As proteínas do soro do leite têm sido aplicadas na microencapsulação de probióticos por diversos autores (PICOT e LACROIX, 2004; KAILASAPATHY e SUREETA, 2004; DOHERTY et al., 2010, 2011). Além de serem utilizadas como material de parede na produção das microcápsulas, as proteínas de soro podem ser utilizadas como material de recobrimento das mesmas, uma vez que o recobrimento promove a deposição de uma camada adicional sobre a superfície da microcápsula, o que em condições adversas, pode aumentar a proteção ao seu conteúdo, como os micro-organismos, por exemplo. Isso é conseguido pela imersão das microcápsulas de gelificação em uma solução de cobertura composta por polímeros (HEIDEBACH et al., 2012).

O soro do leite é um produto obtido da fabricação dos queijos e contém cerca de 0,6% de proteína (HAMBRAEUS e LÖNNERDAL, 2003). Essas proteínas são globulares, com grandes quantidades de estruturas secundárias, terciárias e até

quaternárias e contém pontes dissulfito intramoleculares que estabilizam sua estrutura. São solúveis em pH 4,6 e podem ser desnaturadas com tratamento térmico, sendo o aquecimento a 90°C por 10 minutos, responsável por sua completa desnaturação. As proteínas presentes no soro são a β -lactoglobulina (aproximadamente 50% das proteínas do soro), α -lactoalbumina (aproximadamente 20%), albumina bovina sérica, imunoglobulinas, proteose peptonas e outras proteínas como lactoferrina, lactoperoxidase e transferrina. Um dos produtos que contém essas proteínas é o concentrado proteico de soro (CPS), que é obtido por ultrafiltração e diafiltração do soro doce e pode conter de 35 a 90% de proteínas (FOX, 2001; FOX e KELLY, 2003; CARR et al., 2003; HAMBRAEUS e LÖNNERDAL, 2003). O concentrado proteico de soro tem sido utilizado na microencapsulação como uma das principais fontes de proteínas.

Interações com polissacarídeos podem influenciar as propriedades funcionais das proteínas, como a solubilidade, a estabilidade conformacional, a capacidade de formar gel e as propriedades emulsificantes (YE, 2008). Entretanto, entre proteínas e polissacarídeos aniônicos pode haver uma interação atrativa se esses componentes forem eletricamente compatíveis (ZALESKA et al., 2000). A formação de complexos entre proteínas do leite e polissacarídeos ocorre principalmente por interações eletrostáticas, que são afetados pelo pH, força iônica, carga e concentração do polissacarídeo e a proporção dos biopolímeros (YE, 2008).

Microcápsulas de pectina produzidas por gelificação iônica possuem carga superficial negativa e, desta forma, podem ser recobertas com proteína de soro, por interação eletrostática, quando em soluções com pH abaixo do seu ponto isoelétrico. Além da associação da gelificação iônica com a coacervação complexa, a associação de outras técnicas de microencapsulação pode ser vantajosa, conforme mostrado por Krasaekoopt et al. (2004), Iyer et al. (2005), Oliveira et al. (2007ab) e Annan et al. (2008).

7. SIMULAÇÃO DA PASSAGEM PELO TRATO GASTROINTESTINAL

A simulação das condições adversas encontradas pelo micro-organismo probiótico durante sua passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) é utilizada como referência para avaliar a resistência desses micro-organismos durante o consumo de produtos probióticos. Estas condições incluem baixo pH (1,0 a 3,0), presença de enzimas, tais como pepsina e pancreatina, e sais biliares (KAILASAPATHY e CHIN, 2000; KAILASAPATHY, 2002, 2006; VASILJEVIC e SHAH, 2008). De forma geral, os diversos estudos indicam que a passagem pelo TGI é prejudicial à viabilidade dos micro-organismos probióticos.

A exposição de *L. acidophilus* CSCC 2400 a pH 2,0 por 3 horas na forma livre e microencapsulada em alginato de cálcio por técnica de gelificação iônica, apresentou redução de 5 e 3 ciclos logarítmicos da sua população, respectivamente (CHANDRAMOULI et al., 2004). Fávoro-Trindade e Grosso (2000) também observaram que a microencapsulação de *L. acidophilus* La-05 e *B. lactis* Bb-12 em alginato de sódio por gelificação iônica conferiu proteção aos micro-organismos, os quais não apresentaram redução significativa na população quando submetidos a pH 2,0 por 3 horas. Entretanto, no pH 1,0 ambos os micro-organismos, livres ou encapsulados, apresentaram redução total de sua população após uma hora de exposição, possivelmente, devido à porosidade do gel de alginato que permitiu a difusão de íons H⁺ para o interior das cápsulas, afetando a viabilidade das células bacterianas.

O efeito protetivo conferido a *L. acidophilus* 547, *B. bifidum* ATCC 1994 e *L. casei* 01 frente a condições ácidas (pH 1,55 por 2 horas) foi avaliado após recobrimento de microcápsulas de alginato de sódio obtidas por gelificação iônica por Krasaekoopt et al. (2004). Foram testados três tipos de materiais, quitosana, alginato de sódio e poli-L-lisina combinados com alginato. Os resultados indicaram que as cápsulas de alginato recobertas com quitosana conferiram maior proteção para *L. acidophilus* 547 e *L. casei* 01 quando comparados aos outros materiais de recobrimento. Entretanto, o recobrimento das cápsulas não foi eficiente na proteção de *B. bifidum* ATCC 1994 nas condições ácidas avaliadas (KRASAEKOOPT et al., 2004).

A utilização de proteínas como matriz ou como cobertura na produção de microcápsulas parece ser promissora, uma vez que promove proteção substancial para os micro-organismos probióticos durante o trânsito gastrointestinal (HEIDEBACH et al., 2012). Gbassi et al. (2009) avaliaram a sobrevivência de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado em alginato de sódio por técnica de gelificação iônica, com e sem recobrimento com proteínas de soro, durante exposição a suco gástrico artificial (pH 1,8) e suco intestinal artificial (pH 6,5). Os autores observaram maior proteção ao micro-organismo probiótico quando nas microcápsulas recobertas.

Microcápsulas de isolado protéico de soro produzidas através de secagem por atomização foram eficazes para proteger *B. breve* R070 e *B. longum* R023 submetidos a condições que simulam o trato gastrointestinal humano, pH 1,9 e 7,5 com presença de enzimas pepsina e pancreatina e também sais biliares (PICOT e LACROIX, 2004).

Gerez et al. (2012) produziram microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro contendo *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 e observaram que as microcápsulas conferiram proteção ao micro-organismo quando exposto a pH 1,2 e 3,0, comparado ao micro-organismo livre.

A grande maioria dos estudos mostra que a microencapsulação dos micro-organismos probióticos confere maior viabilidade aos mesmos durante a exposição a condições que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal, sendo efetiva na sua proteção a condições adversas. Entretanto, a eficiência dessa proteção depende de diversos fatores como a técnica e os materiais utilizados na microencapsulação, as condições de simulação do trato gastrointestinal e, principalmente, a cepa utilizada nos estudos.

Micro-organismos probióticos em diferentes tipos de microcápsulas têm sido aplicados em diversos produtos e entre eles os produtos lácteos são os mais estudados, uma vez que são considerados adequados para a veiculação dos mesmos. Embora os leites fermentados sejam os produtos mais estudados, os queijos também têm apresentado vantagens na manutenção da viabilidade dos probióticos.

8. QUEIJOS ADICIONADOS DE MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS

Os queijos são considerados alimentos adequados para a veiculação de micro-organismos probióticos devido ao seu pH, alto teor de gordura e consistência sólida proveniente da sua matriz proteica, além de serem considerados ambientes anaeróbios, contribuindo assim para a manutenção da viabilidade desses micro-organismos, tanto no produto, como na passagem pelo trato gastrointestinal (STANTON et al., 1998; ROSS et al., 2002; VINDEROLA et al., 2002; SHAH, 2007; ÖZER et al., 2008; KARIMI et al., 2011).

As cepas probióticas normalmente utilizadas para fabricação de queijos são de *Lactobacillus* sp. e de *Bifidobacterium* sp. Na maioria dos estudos, a adição de bactérias probióticas é realizada na forma livre para fabricação de diferentes tipos de queijos, sendo o mais estudado o Cheddar (STANTON et al., 1998; DAIGLE et al., 1999; GARDINER et al., 1999; LYNCH et al., 1999; McBREARTY et al., 2001; DARUKARADHYA et al., 2006; PHILIPS et al., 2006; ONG et al., 2006, 2007; ONG e SHAH, 2008, 2009; FORTIN et al., 2011; OBERG et al., 2011; SCHELLER e O'SULLIVAN, 2011). Outros tipos de queijos também têm sido estudados como o Gouda (GOMES et al., 1998), queijo fresco cremoso ultrafiltrado (ROY et al., 1997; VINDEROLA et al., 2000), Pategrás (BERGAMINI et al., 2005, 2009), Feta (KASIMOGLU et al., 2004), Petit Suisse (MARUYAMA et al., 2006; CARDARELLI et al., 2007; PEREIRA et al., 2010), Prato (CICHOSKI et al., 2008); Minas Frescal obtido pelo processo tradicional (BURITI et al., 2005a,b; BURITI et al., 2007; SOUZA et al., 2008; SOUZA e SAAD, 2009; FRITZEN-FREIRE et al., 2010; ALVES et al., 2011) e Minas Frescal obtido por ultrafiltração do leite (RIBEIRO et al., 2009).

Todavia, a adição de micro-organismos probióticos na forma encapsulada também tem sido avaliada para fabricação de queijo Cheddar (DINAKAR e MISTRY, 1994; GARDINER et al., 2002); Crescenza (GOBBETTI et al., 1998), Kasar (ÖZER et al., 2008), queijo branco turco (ÖZER et al., 2009) e queijo branco ultrafiltrado iraniano (ZOMORODI et al., 2011).

Na fabricação da maioria desses queijos a cultura probiótica é adicionada ao leite juntamente com a cultura tradicional e antes da adição do coalho. Em alguns casos, como para o queijo Minas Frescal, que atualmente é fabricado com substituição total ou parcial da cultura láctica por ácido láctico, a cultura probiótica é adicionada ao leite juntamente com o ácido láctico (BURITI et al., 2005a,b). Entretanto, a adição de micro-organismos probióticos microencapsulados também pode ser realizada na massa do queijo (DINAKAR e MISTRY, 1994).

A viabilidade da cultura mista de *B. bifidum*, *B. infantis* e *B. longum*, livres e encapsuladas em alginato de cálcio por técnica de coacervação, foi avaliada no queijo Crescenza, queijo italiano fresco, de alto teor de umidade (~ 60%). Após 14 dias de armazenamento sob refrigeração, observou-se redução de 2 ciclos logarítmicos na contagem de bifidobacterias livres e encapsuladas, indicando a não eficiência desta cápsula na manutenção da viabilidade dos probióticos (GOBBETTI et al., 1998).

Por outro lado, microcápsulas de alginato de sódio obtidas por gelificação iônica contendo *B. bifidum* Bb12 (que foi reclassificada como *B. animalis* subsp. lactis, segundo Masco et al., 2005) conferiram maior proteção ao probiótico em relação ao micro-organismo livre quando adicionadas ao queijo Kasar (queijo turco de massa cozida, semi-duro, com 39% umidade). Os micro-organismos encapsulados apresentaram redução de 2 ciclos logarítmicos enquanto os livres apresentaram redução de 5 ciclos após 90 dias de estocagem a 10°C. Resultados semelhantes foram obtidos para *B. bifidum* Bb12 microencapsulados em κ -carragena por técnica de emulsão, sugerindo a eficácia de ambas as microcápsulas na proteção do probiótico. No mesmo trabalho foi mostrado que *Lactobacillus acidophilus* La5 adicionado ao mesmo queijo na forma livre apresentou redução de 4 ciclos logarítmicos, enquanto que na forma microencapsulada a redução foi de 2 ciclos. A adição dos probióticos microencapsulados não afetou a composição dos queijos, entretanto estes apresentaram menor proteólise em relação ao queijo adicionado de micro-organismos livres (ÖZER et al., 2008).

Microcápsulas de κ -carragena obtidas por gelificação iônica contendo *B. bifidum* 15696 foram adicionadas ao queijo Cheddar (~ 37% umidade, massa semi-cozida) após

a chedarização e o micro-organismo permaneceu viável durante seis meses de maturação a 7°C, apresentando neste período um aumento de 2 ciclos logarítmicos. A adição do micro-organismo encapsulado não afetou a composição, sabor, textura e aparência quando comparado ao queijo controle, sem adição de bactéria probiótica (DINAKAR e MISTRY, 1994).

Ong et al. (2006) também demonstraram que o queijo Cheddar foi efetivo na veiculação de micro-organismos probióticos livres (*L. acidophilus* 4962, *L. casei* 279 e *B. longum* 1941, *L. acidophilus* LAFTI L10, *L. paracasei* LAFTI L26, *B. lactis* B94) adicionados juntamente com a cultura tradicional, uma vez que os micro-organismos sobreviveram ao processo tradicional de fabricação do queijo e mantiveram-se viáveis durante 6 meses de maturação a 4°C, apresentando contagens entre 7,5 e 8,5 log ufc/g. Além disso, os autores observaram que a adição dos micro-organismos probióticos não afetou a composição dos queijos, em relação aos teores de gordura, proteína, umidade e sal. A proteólise foi semelhante até o 4º mês de maturação e a partir daí, foi observado aumento no teor de aminoácidos livres, o que mostra um aumento na proteólise secundária nos queijos com adição de culturas probióticas, provavelmente devido ao aumento da atividade das peptidases provenientes das culturas utilizadas. Também foi observado o aumento da proteólise nos queijos probióticos pelo perfil eletroforético das amostras, que mostraram hidrólise mais rápida e mais intensa da α -caseína nos queijos probióticos. As concentrações de ácido acético foram maiores para os queijos probióticos em relação ao queijo controle, provavelmente devido à adição de *Bifidobacterium* sp., que é capaz de produzir esse ácido durante seu metabolismo. Essa maior concentração de ácido acético pode gerar um defeito sensorial nos queijos, reduzindo sua aceitação. Resultados semelhantes foram observados em outro estudo do mesmo grupo de pesquisa, onde foram adicionados os mesmos micro-organismos, porém separadamente em queijo Cheddar (ONG et al., 2007).

Embora se considere que a sobrevivência de bactérias probióticas em queijos frescos seja maior que nos queijos maturados, devido ao menor tempo de armazenamento, menor teor de sal e maior teor de umidade (BURITI et al, 2005a), a adição de probióticos, livres ou encapsulados, tem se mostrado viável tanto em queijos frescos (Minas Frescal e Crescenza) como em queijos maturados (Gouda, Cheddar,

Pategras, Kasar), submetidos a diferentes tratamentos da massa, incluindo os de massa crua (Minas Frescal e Crescenza) e semi-cozida (Gouda, Cheddar, Pategras). O queijo Prato é um queijo semelhante ao Gouda, podendo ser considerado adequado para a veiculação de probióticos, tanto na forma livre quanto na forma microencapsulada.

9. QUEIJO PRATO

Segundo a legislação brasileira, a partir do Regulamento Técnico Para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Prato (BRASIL, 1997), o queijo Prato é um queijo maturado, obtido por coagulação enzimática do leite, complementada pela ação de bactérias lácticas específicas. É classificado como um queijo gordo, de média umidade e de massa semicozida. O produto deve apresentar consistência semidura, elástica, com textura compacta e lisa, podendo apresentar pequenas olhaduras bem distribuídas. Possui coloração amarelada, com sabor e odor característicos e deve ser maturado por no mínimo 25 dias, em temperatura não superior a 12°C, acondicionado em embalagens plásticas. Sua denominação compreende as variedades Lanche, Cobocó e Bola, de acordo com a forma e peso do produto.

O protocolo geral de fabricação de queijo Prato inclui: pasteurização do leite (72-75°C por 15-20 segundos), resfriamento a aproximadamente 32°C, adição de cultura láctica, cloreto de cálcio e coalho na proporção calculada para a obtenção da coagulação do leite. Após a coagulação, procede-se o corte e o tratamento da massa que inclui agitação, remoção parcial do soro e adição de água quente para promover o semicozimento da massa. Atingido o ponto de massa faz-se a separação do soro, enformagem, prensagem e salga em salmoura. O queijo segue para secagem e embalagem a vácuo para posterior maturação. Um queijo Prato típico apresenta cerca de 42 a 44% de umidade, 26 a 29% de gordura, 1,6 a 1,9% de sal e pH entre 5,2 e 5,4 (FURTADO e LOURENÇO NETO, 1994).

Na fabricação da maioria dos queijos, cepas de diferentes bactérias ácido lácticas cuidadosamente selecionadas são adicionadas ao leite um pouco antes da adição da renina. A principal função é produzir ácido láctico a partir da lactose, e promover

alterações bioquímicas durante a maturação, como a produção de compostos de aroma e sabor, particularmente ácido acético, acetaldeído e diacetil. A produção de ácido por sua vez tem três funções principais: melhora a atividade da renina, ajuda na expulsão do soro da coalhada e na prevenção do desenvolvimento de bactérias indesejáveis no queijo (FOX et al., 2000; PARENTE e COGAN, 2004).

Culturas homofermentativas mesofílicas, como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, são utilizadas em queijos como Cheddar, Gouda, Edam e Camembert, e são as principais responsáveis pela acidificação durante a etapa de fabricação do queijo e nos estágios iniciais da maturação. Ao fermentarem a glicose, produzem exclusivamente ácido láctico L (+) (PARENTE e COGAN, 2004). A ação das enzimas provenientes dos micro-organismos é responsável pelas alterações no aroma, no sabor e na textura que ocorrem durante a maturação, e a intensidade dessas reações é diretamente relacionada aos teores de umidade e sal dos queijos (FOX et al., 2000).

O processo de maturação dos queijos é complexo e envolve reações microbiológicas e bioquímicas que são responsáveis pelo desenvolvimento de características de sabor e textura típicos de cada variedade. As alterações na microbiota do queijo durante a maturação incluem a morte e lise das células da cultura láctica e o desenvolvimento da microbiota secundária. As mudanças bioquímicas envolvem a glicólise, a lipólise e a proteólise, seguidos do desenvolvimento de compostos de sabor e aroma e alterações na textura dos queijos (FOX et al., 2000; MCSWEENEY, 2004).

A proteólise dos queijos é primeiramente responsável pelas mudanças na textura, devido à hidrólise da matriz proteica por enzimas proteolíticas, que gera produtos que vão desde grandes peptídeos a aminoácidos. Esses compostos são substratos para as reações catabólicas que geram compostos sápidos e aromáticos, contribuindo diretamente para o sabor do queijo, entretanto peptídeos hidrofóbicos podem conferir sabor amargo em queijos (FOX et al., 2000; SOUZA et al., 2001; MCSWEENEY, 2004).

A adição de culturas probióticas em queijos pode interferir nas suas características físico-químicas devido à produção de peptidases intracelulares que

podem intensificar a proteólise secundária dos queijos, com a liberação de aminoácidos livres que são precursores importantes de compostos de aroma e sabor (BERGAMINI et al., 2009). Entretanto, é necessário avaliar quais os efeitos da adição de micro-organismos probióticos nos diferentes tipos de queijos.

Não se encontrou na literatura científica nenhum estudo sobre a adição de micro-organismos probióticos livres ou encapsulados ao queijo Prato, com foco na avaliação de suas características físico-químicas e microbiológicas durante o armazenamento do produto. No entanto, a viabilidade de *B. lactis* e *L. acidophilus* livres foi avaliada em queijo Gouda, que é similar ao queijo Prato, de massa semi-cozida, com aproximadamente 42-44% de umidade. *B. lactis* e *L. acidophilus* se mantiveram viáveis por 9 semanas, porém apresentaram redução de 1 e 2 ciclos logarítmicos na suas contagens neste período, respectivamente (GOMES et al., 1998).

De forma geral, os estudos mostram que a viabilidade dos micro-organismos probióticos nos diferentes tipos de queijos, é maior quando esses micro-organismos são adicionados na forma microencapsulada em relação à forma livre. Assim, a microencapsulação é considerada uma alternativa para manter a viabilidade dos probióticos durante o processamento, a estocagem e o consumo desses produtos, garantindo seus efeitos benéficos à saúde do consumidor.

10. REFERÊNCIAS

ADHIKARI, K.; MUSTAPHA, A.; GRÜN, I. U. Survival and metabolic activity of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in stirred yoghurt. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 1, p.275-280, 2003.

AKALIN, A. S.; ERISIR, D. Effects of inulin and oligofructose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice cream. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 4, p. M184-M188, 2008.

ALVES, C. C. C.; GEMAL, N. D. H.; CORTEZ, M. A. S.; FRANCO, R. M.; MANO, S. B. Utilização de *Lactobacillus acidophilus* e de acidificação direta na fabricação de queijo de minas frescal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1559-1566, 2011.

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

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

ARAGON-ALEGRO, L. C. ; ALEGRO, J. H. A. ; CARDARELLI, H. R. ; CHIU, M. C. ; SAAD, S. M. I. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT**, v. 40, p. 669-675, 2007.

ASHRAF, R.; SHAH, N. P. Selective media for enumeration of lactic acid and probiotic organisms in dairy foods. In: SHAH, N.P.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. (Ed.). **Probiotic and Prebiotic Foods: Technology, Stability and Benefits to Human Health**. 1ª Ed. Nova Science Publishers, Inc., New York, 2011, 545 p.

AXELOS, M. A. V. The chemistry of low-methoxyl pectin gelation. In: WALTER, R. H. **The chemistry and technology of pectin**. Academic Press, San Diego, 1991, 272 p.

BERGAMINI, C. V.; HYNES, E. R.; QUIBERONI, A.; SUÁREZ, V. B.; ZALAZAR, C. A. Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. **Food Research International**, v. 38, p. 597-604, 2005.

BERGAMINI, C. V.; HYNES, E. R.; PALMA, S. B.; SABBAG, N. G. ; ZALAZAR, C. A. Proteolytic activity of three probiotic strain in a semi-hard cheese as single and mixed cultures: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 467-475, 2009.

BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology, Ed: HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 9ª Ed., 2000. 787 p.

BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Portaria nº15 de 30 de abril de 1999, que institui, junto a Câmara Técnica de Alimentos, Comissão de Assessoramento Tecnocientífico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Diário Oficial da União**: Brasília, Distrito Federal, 03 de maio de 1999. Seção 2, página 4, 1999.

BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Atualizado em julho de 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA. Portaria nº 358, de 04 de setembro de 1997, que aprova o Regulamento Técnico para Fixação de

Identidade e Qualidade de Queijo Prato. **Diário Oficial da União**: Brasília, Distrito Federal, 08 de setembro de 1997. Seção 1, página 19690. 1997.

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

BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 467-483, 2011.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; SAAD, S. M. I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1279-1288, 2005a.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; ASSIS, E. G.; SAAD, M. I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **LWT**, v. 38, p. 173-180, 2005b.

BURITI, F. C. A.; OKAZAKI, T. Y.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh cheese in comparison with the traditional products. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 57, n. 2, p. 179-185, 2007.

CARR, A. J.; SOUTHWARD, C. R.; CREAMER, L. K. Protein hydration and viscosity of dairy fluids. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. (Ed.) **Advanced Dairy Chemistry: Proteins**. vol. 1. Part B. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. 1346 p.

CARDARELLI, H. R.; BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic *petit-suisse* cheese. **LWT**, v. 41, p. 1037-1046, 2008.

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

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

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Quality control *Lactobacillus* strains for use with the API 50CH and API ZYM systems at 37°C. **Journal of Basic Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 241-251, 2001.

CHRISTIAN HANSEN (Boletim Técnico). Enumeration of *L. acidophilus*, in fermented milk products – Guidelines. **Technical bulletin P-10 - L.acidophilus** enumeration, nov. 2007.

CICHOSKI, A. J.; CUNICO, C.; DI LUCCIO, M.; ZITKOSKI, J. L.; CARVALHO, R. T. Efeito da adição de probióticos sobre as características de queijo prato com reduzido teor de gordura fabricado com fibras e lactato de potássio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 214-219, 2008.

DAIGLE, A.; ROY, D.; BÉLANGER, G.; VUILLEMARD, J. C. Production of probiotic cheese (cheddar-like cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis*. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 1081-1091, 1999.

DARUKARADHYA, J.; PHILIPS, M.; KAILASAPATHY, K. Selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., starter lactic acid bacteria and non-starter lactic acid bacteria from Cheddar cheese. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 439-445, 2006.

DAVE, R. I; SHAH, N. P. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and Bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v.79, p. 1524-1536, 1996.

DAVE, R. I; SHAH, N. P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 31-41, 1997.

DI CRISCIO, T.; FRATIANNI, A.; MIGNOGNA, R.; CINQUANTA, L.; COPPOLA, R.; SORRENTINO, E.; PANFILI, G. Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 4555-4564, 2010.

DINAKAR, P.; MISTRY, V. V. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2854-2864, 1994.

DING, W. K.; SHAH, N. P. Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. M446-M450, 2007.

DOHERTY, S. B.; GEE, V. L.; ROSS, R. P.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; BRODKORB, A. Efficacy of whey protein gel networks as potential viability-enhancing scaffolds for cell immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, p. 231-241, 2010.

DOHERTY, S. B.; GEE, V. L.; ROSS, R. P.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; BRODKORB, A. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1604-1617, 2011.

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

DONKOR, O. N.; NILMINI, S. L. I.; STOLIC, P.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 657-665, 2007.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.** Córdoba, 2001. 34 p. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION Probiotic in foods. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. **FAO Food and Nutrition Paper** 85, 2006, 56p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>.

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

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n. 4, p. 485-494, 2002

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

FORTIN, M. H.; CHAMPAGNE, C. P.; ST-GELAIS, D.; BRITTEN, M.; FUSTIER, P.; LACROIX, M. Effect of time of inoculation, starter addition, oxygen level and salting on the viability of probiotic cultures during Cheddar cheese production. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 75-82, 2011.

FOX, P. F. Milk proteins as food ingredients. **International Journal of Dairy Technology**, v. 54, n. 2, p. 41-55, 2001.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science.** Aspen, Gaithersburg: Aspen. 2000. 587 p.

FOX, P. F.; KELLY, A. L. Developments in the chemistry and technology of milk proteins 1. Overview of major milk proteins. **Food Australia**, v. 55, n. 3, p. 104- 108, 2003.

FRANZ, C. M. A. P.; CHO, G. S.; HOLZAPFEL, W. H. Probiotics: taxonomy and technological features. In: SHAH, N.P.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. (Ed). **Probiotic and Prebiotic Foods: Technology, Stability and Benefits to Human Health.** 1ª Ed. Nova Science Publishers, Inc., New York, 2011, 545 p.

FRITZEN-FREIRE, C. B.; MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDÊNCIO, E. S. The effect of direct acidification on the microbiological, physicochemical and sensory properties of probiotic Minas Frescal cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 4, p. 561-568, 2010.

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

- FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. **Tecnologia de queijos**. Manual técnico para produção industrial de queijos. São Paulo: Dipemar, 1994. 118 p.
- 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**, v. 82, p. 1379-1387, 1999.
- GARDINER, G. E.; BOUCHIER, P.; O'SULLIVAN, E.; KELLY, J.; COLLINS, J. K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R. P.; STANTON, C. A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 749-756, 2002.
- GBASSI, G. K.; VANDAMME, T.; ENNAHAR, S.; MARCHIONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 1, p. 103-105, 2009.
- GEREZ, C. L.; FONT DE VALDEZ, G. GIGANTE, M. L.; GROSSO, C. R. F. Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamninosus* CRL 1505 to low pH. **Letter in Applied Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 552-556, 2012.
- GIBBS, B. F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C. N. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, p. 213-224, 1999.
- GOBBETTI, M.; CORSETTI, A.; SMACCHI, E. ZOCCHETTI, A.; ANGELIS, M. Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 37-47, 1998.
- GOMES, A. M. P.; VIEIRA, M. V.; MALCATA, F. X. Survival of probiotic microbial strains in a cheese matrix during ripening: simulation of rates of salt diffusion and microorganism survival. **Journal of Food Engineering**, v. 36, p. 281-301, 1998.
- GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**. v. 10, n. 4/5, p. 139-157, 1999.
- GROSSO, C. R. F.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yoghurt. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 151-156, 2004.
- HAMBRAEUS, L.; LÖNNERDAL, B. Nutritional aspects of milk proteins. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. (Ed) **Advanced Dairy Chemistry: Proteins**. vol. 1. Part B. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. 1346 p.
- HAMMES, W. P.; HERTEL, C. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of**

Bacteria. - Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacter. 3^a ed. Springer Science Business Media, LLC, 2006, 1140 p.

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

HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, p. 291-311, 2012.

HEKMAT, S.; McMAHON, D. J. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 1415-1422, 1992.

HOMAYOUNI, A.; AZIZI, A.; EHSANI, M. R.; YARMAND, M. S.; RAZAVI, S. H. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of symbiotic ice cream. **Food Chemistry**, v. 111, p. 50-55, 2008.

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

IDF. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Fermented and non-fermented milk products - Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus* - culture media. **Bulletin of the IDF**, n. 306, p. 23-33, 1995.

IDF 149/ISO 27205. Fermented milk products – Bacterial starter cultures – Standard of identity. Switzerland, 2010.

IYER, C.; PHILLIPS, M.; KAILASAPATHY, K. Release studies of *Lactobacillus casei* strain shirota from chitosan-coated alginate-starch microcapsules in *ex vivo* porcine gastrointestinal contents. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p. 493-497, 2005.

KAILASAPATHY, K. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 39-48, 2002.

KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. **LWT** v. 39, p. 1221-1227, 2006.

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

KAILASAPATHY, K.; SUREETA, B. S. Effect of storage on shelf life and viability of freeze-dried and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* cultures. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 59, n. 3, p. 204-208, 2004.

KARIMI, R.; MORTAZAVIAN, A. M.; DA CRUZ, A. G. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. **Dairy Science and Technology**, v. 91, p. 283–308, 2011.

KARIMI, R.; MORTAZAVIAN, A. M.; AMIRI-RIGI, A. Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese. **Food Microbiology**, v. 29, p. 1-9, 2012.

KASIMOGLU, A.; GÖNCÜOĞLU, M.; AKGÜN, S. Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. **International Dairy Journal**, v. 14, p.1067-1073, 2004.

KLAENHAMMER, T. R. Functional activities of *Lactobacillus* probiotics: genetic mandate. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 497-505, 1998.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 737-743, 2004.

LAHTINEN, S. J.; SANCHEZ, B.; FORSSTEN, S.; OUWEHAND, A. C.; GUEIMONDE, M. Enumeration and viability assessment of probiotic bacteria. In: SHAH, N.P.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. (Ed). **Probiotic and Prebiotic Foods: Technology, Stability and Benefits to Human Health**. 1^a Ed. Nova Science Publishers, Inc., New York, 2011, 545 p.

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

LEE, Y. L.; SALMINEN, S. The coming age of probiotics. **Trends of Food Science and Technology**, v. 6, p. 241-245, 1995.

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

LIU, L.; FISHMAN, M. L.; KOST, J.; HICKS, K. B. Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. **Biomaterials**, v. 24, n. 19, p. 3333- 3343, 2003.

LYNCH, C. M.; MUIR, D. D.; BANKS, J. M.; McSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. Influence of adjunct cultures of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* or *Lactobacillus plantarum* on Cheddar cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 1618-1628, 1999.

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

MARGOLLES, A.; MAYO, B.; RUAS-MADIEDO, P. Screening, identification, and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. In: **Handbook of**

probiotics and prebiotics. LEE, W. K.; SALMINEN, S.(Ed.) – 2^a ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2009. 506 p.

MARUYAMA, L. Y.; CARDARELLI, H. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Textura instrumental de queijo petit-suisse potencialmente probiótico: influência de diferentes combinações de gomas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 02, p. 386-393, 2006.

MASCO, L.; HUYS, T. G.; DE BRANDT, E. TEMMERMAN, R.; SWINGS, J. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, P. 221-230, 2005.

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

MC BREARTY, S.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COLLINS, J. K.; WALLACE, J. M. ; STANTON, C. Influence of two commercially available bifidobacteria cultures on cheddar cheese quality. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 599-610, 2001.

MCSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening: introduction and overview. In: FOX P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. **Cheese – Chemistry, physics, and microbiology** – vol. 1 – General Aspects. 3^a ed. London, 2004, 617 p.

MORTAZAVIAN, A. M.; EHSANI, M. R.; SOHRABVANDI, S.; REINHEIMER, J. A. MRS-bile ágar: its suitability for the enumeration of mixed probiotic cultures in cultured dairy products. **Milchwissenschaft**, v. 62, n. 3, p. 270-272, 2007.

OBERG, C. J.; MOYES, L. V.; DOMEK, M. J.; BROTHERSEN, C.; McMAHON, D. J. Survival of probiotic adjunct cultures in cheese and challenges in their enumeration using selective media. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2220-2230, 2011.

O'FLAHERTY, S.; KLAENHAMMER, T. R. The role and potential of probiotic bacteria in the gut, and the communication between gut microflora and gut/host. **International Dairy Journal** v. 20, p.262–268, 2010.

OLIVEIRA, A. C.; MORETTI, T. S.; BOSCHINI, C.; BALIERO, J. C. C.; FREITAS, L. A. P.; FREITAS, O.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spouted-bed drying. **Drying Technology**, v. 25, p. 1687-1693, 2007a.

OLIVEIRA, A. C.; MORETTI, T. S.; BOSCHINI, C.; BALIERO, J. C. C.; FREITAS, O.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, v. 24, n, 7, p. 685-693, 2007b.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N. P. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 446-456, 2006.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N. P. Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium* sp. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 67-78, 2007.

ONG, L.; SHAH, N. P. Influence of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *L. helveticus* on proteolysis, organic acid profiles, and ACE-inhibitory activity of cheddar cheeses ripened at 4, 8, and 12°C. **Journal of Food Science**, v, 73, n. 3, p. M111-M120, 2008.

ONG, L.; SHAH, N. P. Probiotic Cheddar cheese: influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. **LWT – Food Science and Technology**, v. 42, p. 1260-1268, 2009.

ÖZER, B.; UZUN, Y. S.; KIRMACI, H. A. Effect of microencapsulation on viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 during Kasar cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v. 61, n. 3, p. 237-244, 2008.

ÖZER, B.; KIRMACI, H. A.; SENEL, E.; ATAMER, M.; HAYALOGLU, A. Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 22-29, 2009.

PARENTE, E.; COGAN, T. M. Starter cultures: general aspects. In: FOX P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. **Cheese – Chemistry, physics, and microbiology** – vol. 1 – General Aspects. 3^a ed. London, 2004, 617 p.

PEREIRA, L. C.; DE SOUZA, C. H. B.; BEHRENS, J. H.; SAAD, S. M. I. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* sp. in co-culture improve sensory acceptance of potentially probiotic petit-suisse cheese. **Acta Alimentaria**, v. 39, n. 3, p. 265-276, 2010.

PHILIPS, M.; KAILASAPATHY, K.; TRAN, L. Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in Cheddar cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 276-280, 2006.

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

PRATA, A. S. **Estudo dos parâmetros físico-químicos envolvidos na formação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa**. Tese (Doutorado em

Alimentos e Nutrição) Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA/UNICAMP. 2006, 228f.

RIBEIRO, E. P.; SIMÕES, L. G.; JURKIEWICZ, C. H. Desenvolvimento de queijo minas frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentado de ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 1-5, 2009.

ROSS, R. P.; FITZGERALD, G.; COLLINS, K.; STANTON, C. Cheese delivering biocultures – probiotic cheese. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2, p. 71-78, 2002.

ROY, D.; MAINVILLE, I.; MONDOU, F. Selective enumeration and survival of Bifidobacteria in fresh cheese. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 785-793, 1997.

SCHELLER, M.; O'SULLIVAN, D. J. Comparative analysis of an intestinal strain of *Bifidobacterium longum* and a strain of *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* in Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 94 p. 1122–1131, 2011.

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

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

SHAH, N.P., LANKAPUTHRA, W.E.V. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt. **International Dairy Journal**, v.7, p.349-356, 1997.

SHAH, N. P.; LANKAPUTHRA, W. E. V.; BRITZ, M. L.; KYLE W. S. A. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. **International Dairy Journal**, v. 5, p. 515-521, 1995.

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

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

SMRDEL, P.; BOGATAJ, M.; ZEGA, A.; PLANINŠEK, O.; MRHAR, A. Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by ionotropic gelation. **Journal of Microencapsulation**, v. 25, n. 2, p. 90-105, 2008.

SOUZA, C. H. B.; BURITI, F. C. A.; BEHRENS, J. H.; SAAD, M. I. Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a thermophilic starter culture. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 871-877, 2008.

- SOUZA, C. H. B.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-chemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. **LWT- Food Science and Technology**, v. 42, p. 633-640, 2009.
- SOUZA, M. J.; ARDÖ, Y.; MCSWEENEY, P. L. H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 327-345, 2001.
- 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.
- TABASCO, R.; PAARUP, T.; JANER, C.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1107-1114, 2007.
- TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yoghurt – Science and Technology**. 2^a Ed. CRC Press, Cambridge, 1999, 605p.
- THAKUR, B. R.; SINGH, R. K.; HANDA, A. K. Chemistry and uses of pectin - a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 1, p. 47-73, 1997.
- TERZAGHI, B.E., SANDINE, W.E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. **Applied Microbiology**, v. 29, p. 807-813, 1975.
- THARMARAJ, N., SHAH, N. P. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and propionibacteria. **Journal of Dairy Science**. v. 86, n. 7, p. 2288-2296. 2003.
- TUOHY, K. M.; PROBERT, H. M.; SMEJKAL, C. W.; GIBSON, G. R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 15, p. 692-700, 2003.
- VAN DE CASTEELE, S., VANHEUVERZWIJN, T., RUYSSSEN, T., VAN ASSCHE, P., SWINGS, J. AND HUYS, G. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. **International Dairy Journal**, v.16, p.1470-1476. 2006.
- VASILJEVIC, T. SHAH, N. P. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 714-728, 2008.
- VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 497-505, 1999.

VINDEROLA, C. G.; PROSELLO, W.; GHIBERTO, D.; REINHEIMER, J. A. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in argentinian fresco cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1905-1911, 2000.

VINDEROLA, C. G.; MOCCHIUTTI, P.; REINHEIMER, J. A. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 721-729, 2002.

WEINBRECK F.; NIEUWENHUIJSE H.; ROBIJN, G.W.; DE KRUIF, C.G. Complex formation of whey proteins: exocellular polysaccharide EPS B40, **Langmuir**, v. 19, p. 9404-9410, 2003.

WEINBRECK F.; MINOR, M.; DE KRUIF, C.G. Microencapsulation of oils using whey protein/gum arabic coacervates. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, n. 6, p. 667-679, 2004a.

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

YE, A. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 3, p. 406-415, 2008.

ZALESKA, H.; RING, S. G.; TOMASIK, P. Apple pectin complexes with whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v. 14, p. 377-382, 2000.

ZOMORODI, S.; KHOSROSHAHI, A.; ROHANI, S., M. R.; MIRAGHAEI, S. Survival of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium bifidum* in free and microencapsulated forms on Iranian white cheese produced by ultrafiltration. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 1, p. 84-91, 2011.

CAPÍTULO 2

CONTAGEM SELETIVA DE *Lactobacillus acidophilus* La5 EM QUEIJO PRATO

CAPÍTULO 2 - CONTAGEM SELETIVA DE *Lactobacillus acidophilus* La5 EM QUEIJO PRATO

RESUMO

Para uma escolha segura e confiável do meio de cultura utilizado para a contagem seletiva de micro-organismos probióticos em produtos lácteos fermentados, é necessário avaliar diferentes meios de cultura e condições de incubação, tanto para o produto em estudo como para as culturas puras, pois a presença de diferentes micro-organismos pode interferir nos resultados. O objetivo deste capítulo foi avaliar diferentes metodologias utilizadas para a contagem seletiva de *Lactobacillus acidophilus* em presença de lactococos e, assim, selecionar uma metodologia eficiente para a avaliação da viabilidade de *L. acidophilus* em queijo Prato probiótico produzido com adição de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Foram utilizadas quatro metodologias para a contagem seletiva de *L. acidophilus*, todas em condições de anaerobiose: 1) ágar MRS com adição de solução de bile; 2) ágar MRS com adição de solução de clindamicina, ambos incubados a 37°C por 72 horas; 3) ágar MRS com adição de sorbitol incubado a 37°C e 4) ágar MRS com adição de solução de sorbitol incubado a 45°C, por 72 horas. Para a contagem de *Lactococcus lactis* foi utilizado ágar M17 suplementado com lactose, incubado a 30°C e a 37°C, ambos em condições de aerobiose por 48-72 horas. Todas as metodologias foram utilizadas tanto no plaqueamento de culturas puras de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactococcus lactis* como no plaqueamento do queijo Prato probiótico produzido com a adição dessas duas culturas. Os resultados mostraram que o meio efetivamente seletivo para a contagem de *Lactobacillus acidophilus* em queijo Prato foi o ágar MRS adicionado de sorbitol e incubado a 45°C, e para a contagem de *Lactococcus lactis* o meio selecionado foi o ágar M17 incubado a 30°C, uma vez que nesses meios somente se desenvolveram os micro-organismos de interesse.

1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos probióticos tem se tornado um componente significativo da indústria de produtos funcionais, contribuindo para um mercado que envolve bilhões de dólares (O'FLAHERTY e KLAENHAMMER, 2010). Os produtos lácteos têm sido os mais utilizados para a veiculação dos probióticos, entretanto, a viabilidade dos micro-organismos probióticos em produtos lácteos deve ser avaliada através de um método que permita a enumeração seletiva desses micro-organismos nos produtos aos quais foram adicionados. Diversos métodos para enumeração de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. têm sido propostos, entretanto, a maioria é baseada na contagem de culturas puras e não em matrizes complexas como os alimentos (SHAH, 2000; VASILJEVIC e SHAH, 2008; LAHTINEN et al., 2011). A escolha da metodologia para a contagem seletiva de cepas probióticas em combinação com fermentos lácteos depende dos micro-organismos presentes e da matriz em questão. Como consequência, a escolha do meio deve considerar cada caso, considerando que um único meio não é adequado para uma diversidade de aplicações (VAN DE CASTEELE et al. 2006; KARIMI et al., 2012).

A enumeração de micro-organismos probióticos em queijos para identificar espécies ou gêneros não deve ser realizada por uma condição previamente definida na literatura, sendo necessário o conhecimento da microbiota residual do produto, uma vez que a matriz dos queijos é bastante complexa e pode influenciar as taxas de sobrevivência de outras culturas presentes, subestimando ou superestimando suas populações (OBERG et al., 2011).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar diferentes metodologias utilizadas para a contagem seletiva de *Lactobacillus acidophilus* em presença de lactococos, e assim selecionar uma metodologia eficiente para a avaliação da viabilidade de *L. acidophilus* em queijo Prato probiótico produzido com adição de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Meios de cultura

A partir de metodologias descritas na literatura para a contagem seletiva de *Lactobacillus acidophilus* em queijos, foram escolhidos para este experimento os meios e condições de incubação apresentados no Quadro 1. Quatro metodologias foram selecionadas para a contagem seletiva de *L. acidophilus*, todas realizadas em condições de anaerobiose: 1) ágar MRS com adição de solução de bile; 2) ágar MRS com adição de solução de clindamicina, todos incubados a 37°C por 72 horas; 3) ágar MRS com adição de solução de sorbitol incubado a 37 °C por 72 horas; e 4) ágar MRS com adição de solução de sorbitol incubado a 45°C, por 72 horas.

Para a contagem de *Lactococcus lactis*, foi utilizado ágar M17 suplementado com lactose em duas temperaturas de incubação, 30 e 37°C por 48-72 horas, ambos em condições de aerobiose.

Após o período de incubação, colônias típicas presentes nas placas foram fixadas em lâminas e submetidas à coloração de Gram, com observação em microscópio óptico para visualização da morfologia das colônias.

Quadro 1: Meios utilizados para enumeração de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactococcus lactis* em queijo Prato probiótico.

Meios de cultura	Meio base + suplementos	Condições de incubação	Micro-organismo alvo	Referência
MRSB	Ágar MRS adicionado de 1,5% solução bile a 10% (p/v) *	37°C, 72 horas, anaerobiose	<i>L. acidophilus</i>	IDF (1995)
MRSC	Ágar MRS adicionado de solução de clindamicina * (0,5 ppm)	37°C, 72 horas, anaerobiose	<i>L. acidophilus</i>	Christian Hansen (2007)
MRS + S	Ágar MRS adicionado de 1% de sorbitol (10% solução de sorbitol a 10% p/v) como única fonte de carboidrato*	37°C, 72 horas, anaerobiose	<i>L. acidophilus</i>	Ong et al. (2006)
MRSS	Ágar MRS adicionado de 10% sorbitol (p/p) como única fonte de carboidrato	45°C, 72 horas, anaerobiose	<i>L. acidophilus</i>	Oberg et al. (2011)
M17 37	Ágar M17 adicionado de 5 % de solução de lactose 10% (p/v)*	37°C, 72 horas, aerobiose	<i>Lactococcus lactis</i>	Kasimoglu et al. (2004)
M17 30	Ágar M17 adicionado de 5 % de solução de lactose 10% (p/v) *	30°C, 72 horas, aerobiose	<i>Lactococcus lactis</i>	Terzaghi e Sandine (1975)

* adição das soluções estéreis ao meio MRS estéril imediatamente antes do uso.

Neste trabalho, foram produzidos queijos Prato probióticos, que foram avaliados um dia após a fabricação. Para efeito de comparação entre os resultados, foram analisados os queijos probióticos e as culturas utilizadas na fabricação, seja a cultura pura de *Lactobacillus acidophilus* La5 (Christian Hansen, Valinhos) ou a cultura de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Christian Hansen, Valinhos), utilizando-se as mesmas condições de incubação, conforme mostra a Figura 1. O experimento completo foi repetido quatro vezes.

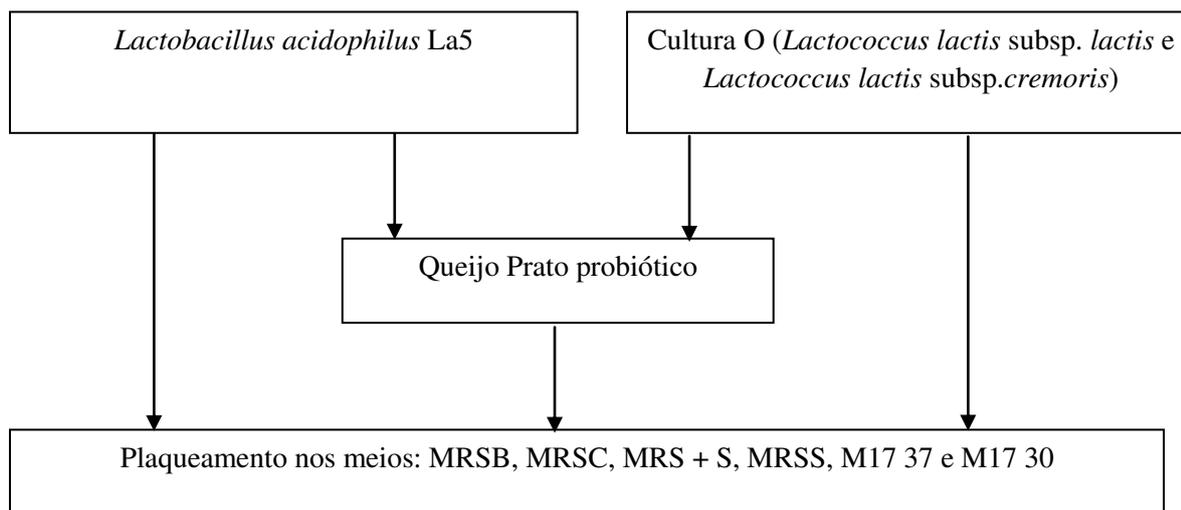


Figura 1 – Fluxograma geral do experimento. MRSB: ágar MRS adicionado de solução de bile incubado a 37°C, MRSC: ágar MRS adicionado de solução de clindamicina incubado a 37°C, MRS + S: ágar MRS adicionado de solução de D-sorbitol incubado a 37°C; MRSS: ágar MRS adicionado de D-sorbitol incubado a 45°C; M17 37: ágar M17 incubado a 37°C; M17 30: ágar M17 incubado a 30°C.

2.2. Preparo do inóculo

A cultura liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* La5 foi reidratada (a 15°C por 20 minutos) em leite desnatado reconstituído estéril e adicionado de 20% (v/v) de glicerol (crioprotetor), transferida para microtubos tipo Eppendorf e mantida sob congelamento (-18°C). Para o processamento, esta cultura foi reativada em caldo MRS (2% v/v) por duas vezes consecutivas, com incubação a 37°C por 15 horas. A temperatura utilizada para a incubação foi a sugerida pelo fabricante da cultura e o tempo foi determinado pela curva de crescimento do *Lactobacillus acidophilus* que é apresentada no Anexo 1. A cultura reativada foi centrifugada a 7.974 g por 10 minutos a 4°C (Centrífuga Sorvall Instruments RC5C – DUPONT), em tubos de polipropileno esterilizados. O concentrado de células obtido após a centrifugação foi resuspenso em água peptonada (0,1% v/v) e centrifugado novamente nas mesmas condições, seguido de resuspensão em água peptonada para obtenção de um concentrado de células com 10^9 - 10^{10} UFC/mL. A viabilidade do concentrado de células foi avaliada por plaqueamento em profundidade em ágar MRS, com incubação a 37°C por 72 horas em jarras de anaerobiose usando gerador de anaerobiose GasPak (DE MAN et al., 1960).

Um concentrado celular de *Lactobacillus acidophilus* foi preparado para cada processamento de queijo Prato probiótico. Além do concentrado de células, *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* foi inoculado em leite desnatado reconstituído estéril e incubado a 30°C por 16 horas para ser utilizado tanto na análise de cultura pura como na fabricação dos queijos.

2.3. Fabricação do queijo Prato

Para a fabricação do queijo Prato, utilizaram-se 20 L de leite (Laticínio Atilatte – Fazenda Atibainha, Atibaia, SP) pasteurizado (63°C/30 minutos) e resfriado a 35°C. Adicionou-se cultura láctica tipo O (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* - R704, Chr. Hansen) na proporção de 1% (v/v) sobre o volume de leite, cloreto de cálcio (250 ppm), corante urucum (80 ppm) e coagulante (Ha La 1175, Chr. Hansen) em quantidade suficiente para coagulação em 35 minutos. Após 35 minutos, o coágulo foi cortado em cubos de 1 cm de aresta, com agitação lenta progressiva durante 15 minutos, seguido de repouso por 5 minutos. Realizou-se a dessoragem parcial, através da remoção de 30% do volume do soro, seguido de adição de água a 80°C, para a etapa de cozimento da massa até 42°C, com aumento gradativo de 1°C a cada 3 minutos até atingir o ponto de massa. Após a etapa de cozimento, o soro foi parcialmente drenado e a massa foi adicionada de 1% de concentrado celular de *L. acidophilus*. O restante do soro foi drenado, a massa enformada em formas retangulares de 0,5 kg, e prensada (30psi por 30 min e 50psi por 90 min.) em prensa pneumática. Após o início da prensagem, os queijos permaneceram por 5 horas em temperatura ambiente para fermentação, seguida de salga em salmoura (20%) por 10 horas (5°C). Ao final da salga, os queijos foram secos por 48 horas (12°C) e embalados a vácuo. Os queijos foram armazenados a 12°C e avaliados após 1 dia de fabricação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados (log UFC/g) das contagens de micro-organismos presentes nas culturas puras e no queijo Prato adicionado de *Lactobacillus acidophilus* estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Análises microbiológicas dos queijos Prato adicionados de *Lactobacillus acidophilus* e das culturas puras de *Lactobacillus acidophilus* La5 e *Lactococcus lactis* (*L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*) utilizando diferentes meios (n= 4). Valores expressos em log UFC/g.

Meios de cultura	CONTAGENS NAS CULTURAS		CONTAGENS NOS QUEIJOS
	PURAS		
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. lactis</i>	
MRSB ¹	9,75 ± 0,02	8,81 ± 0,38	9,34 ± 0,21
MRSC ²	9,62 ± 0,19	6,19 ± 0,92	6,24 ± 1,01
MRS + S ³	9,70 ± 0,08	9,51 ± 0,23	9,61 ± 0,09
MRSS ⁴	9,70 ± 0,06	< 2	6,55 ± 0,51
M17 37 ⁵	3,19 ± 1,71	9,56 ± 0,22	9,6 ± 0,10
M17 30 ⁶	< 2	9,52 ± 0,19	9,59 ± 0,10

¹Ágar MRS adicionado de 1,5% solução de bile a 10% (p/v), incubado a 37°C por 72 h em anaerobiose, ²Ágar MRS adicionado clindamicina (0,5 ppm), incubado a 37°C por 72 h em anaerobiose, ³Ágar MRS adicionado de 1% de sorbitol (10% solução de sorbitol a 10%, p/v) como única fonte carboidrato, incubado a 37°C por 72 h em anaerobiose, ⁴Ágar MRS adicionado 10% sorbitol como única fonte carboidrato, incubado a 45°C por 72 h em anaerobiose, ⁵Ágar M17 adicionado de 5% de solução de lactose 10% (p/v) incubado a 37°C por 72 horas em aerobiose, ⁶Ágar M17 adicionado de 5% de solução de lactose 10% (p/v) incubado a 30°C por 72 horas em aerobiose.

Analisando os resultados apresentados na Tabela 1, pode-se observar que o meio efetivamente seletivo para contagem de *L. acidophilus* foi o MRSS incubado a 45°C por 72 horas em anaerobiose, uma vez que nesta condição, observou-se o desenvolvimento da cultura pura de *Lactobacillus acidophilus* (9,70 ± 0,06 UFC/mL) e a inibição do *Lactococcus lactis* (< 2 UFC/mL). Por outro lado, o meio seletivo para contagem do *Lactococcus lactis* foi o M17 adicionado de lactose e incubado a 30°C em aerobiose, pois nessas condições apenas o *Lactococcus lactis* é capaz de se desenvolver em altas contagens (9,52 ± 0,19 UFC/mL). Em ambos os meios, a contagem foi realizada sem necessidade de avaliações complementares, com presença de colônias típicas e de fácil visualização, conforme mostrado nas Figuras 2 e 3. De forma complementar, na observação da morfologia das colônias pela visualização em microscópio óptico após fixação em lâminas e coloração de Gram, notou-se com clareza que as colônias isoladas

das placas apresentaram a morfologia de cocos (M17 30) e bastonetes (MRSS), tanto nas amostras de queijos, quanto nas amostras de culturas puras (Figura 4 – A e B).

O concentrado celular de *L. acidophilus* adicionado na fabricação dos queijos probióticos (1% v/p) apresentou contagem média de $10,24 \pm 0,24$ log UFC/mL. Espera-se, por efeito da diluição, uma redução de, no mínimo, 2 ciclos logarítmicos sobre a contagem de *L. acidophilus* no queijo. Desta forma, os resultados superiores a 9 log UFC/g de queijo, encontrados nos meios MRSB e MRS+S não são apenas de *L. acidophilus*, pois conforme observado na Tabela 1, o *Lactococcus lactis* é capaz de se desenvolver nesses meios em altas contagens. Tal fato pode levar à afirmação de que os meios MRS+S e MRSB não foram seletivos para *L. acidophilus* La5 em presença de *L. lactis* em queijo Prato. Assim, as altas contagens encontradas no queijo Prato, quando esses meios foram utilizados (Tabela 1), incluem o *Lactococcus lactis*, podendo também incluir outros micro-organismos como as NSLAB. A presença dos lactococos foi confirmada com a observação microscópica da morfologia das culturas isoladas dessas placas, onde foram observados cocos (Figura 4-C). A não seletividade do MRS+S para *L. acidophilus* em queijos também foi observada por Oberg et al. (2011).

A contagem de *Lactobacillus acidophilus* obtida com o MRSC, que é o meio recomendado pelo laboratório que comercializa a cultura (Chr. Hansen) apresentou resultados semelhantes aos obtidos com o MRSS. A adição do antibiótico clindamicina ao meio MRS deveria inibir o crescimento do *Lactococcus lactis*, entretanto a clindamicina na concentração utilizada não foi suficiente para inibir totalmente seu desenvolvimento, uma vez que este micro-organismo enquanto cultura pura foi capaz de se desenvolver no MRSC. Portanto, este meio não foi o escolhido como efetivamente seletivo para a contagem de *L. acidophilus* em queijo Prato, uma vez que a presença de ambos os micro-organismos poderia comprometer a contagem. Quanto aos resultados obtidos com o MRSS, acredita-se que esses sejam os resultados reais em relação à população de *L. acidophilus* obtidos no queijo, uma vez que se observou a presença de bacilos nas lâminas produzidas a partir das colônias isoladas dessas placas.

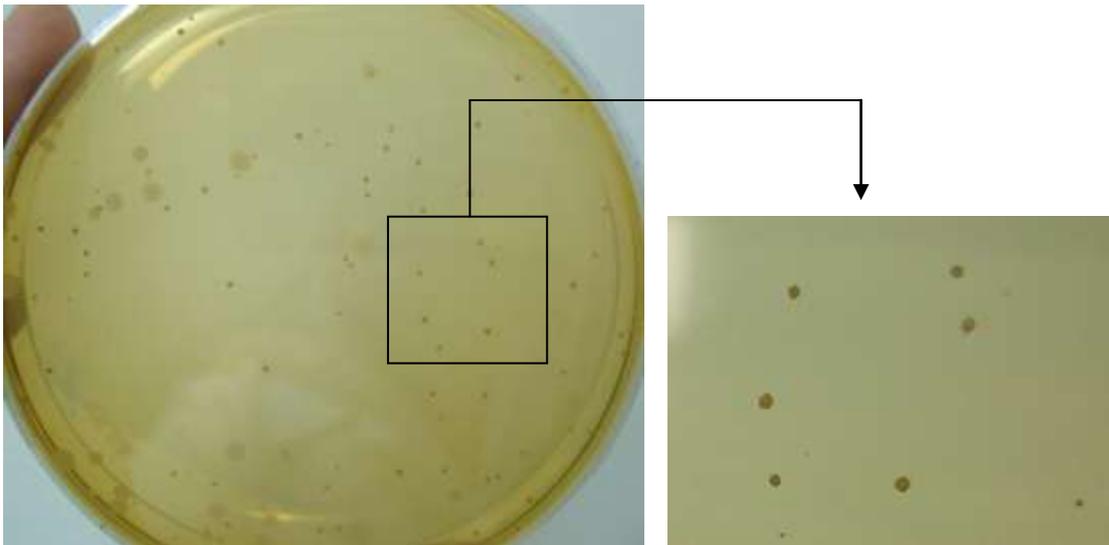


Figura 2 - Aspecto macroscópico das colônias de *L. acidophilus* em meio MRSS incubado a 45°C por 72 horas em anaerobiose.

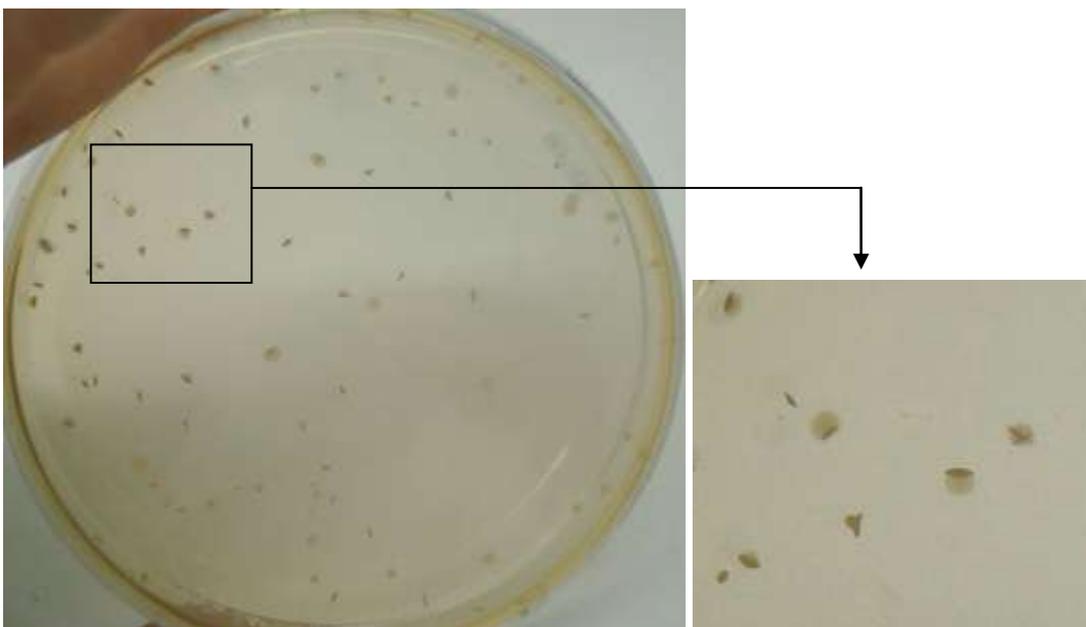


Figura 3 - Aspecto macroscópico das colônias de *L. lactis* em meio M17 incubado a 30°C por 72 horas em aerobiose.



Figura 4 - Microscopia óptica de colônias isoladas de placas com amostras de queijo Prato probiótico contendo *L. acidophilus*. Aumento de 125X. **A:** M17 30: ágar M17 incubado a 30°C, **B:** MRSS: ágar MRS adicionado de D-sorbitol incubado a 45°C; **C:** MRS + S: ágar MRS adicionado de solução de D-sorbitol incubado a 37°C.

É importante ressaltar que, embora haja na literatura a descrição de contagens seletivas bem sucedidas com determinados meios, sempre se deve testar os meios em questão, pois a seletividade está diretamente relacionada com a presença de outras cepas de micro-organismos presentes. Na presença de micro-organismos pertencentes ao mesmo gênero (por exemplo, duas espécies de *Lactobacillus*) essa contagem seletiva é dificultada, o que leva à necessidade de testes preliminares mais criteriosos, com diferentes meios e temperaturas, realizando a análise com as culturas puras e com os produtos probióticos. Uma avaliação criteriosa da eficiência do meio de cultura seletivo deve ser realizada para que não hajam resultados superestimados durante o desenvolvimento do trabalho, uma vez que alguns meios não selecionam efetivamente a cultura probiótica, como observado por diversos autores (VAN DE CASTEELE et al., 2006; VINDEROLA et al., 2010; OBERG et al., 2011). No caso de aplicação de probióticos em queijos é necessário que os meios escolhidos sejam avaliados previamente na matriz em questão, pois o queijo é uma matriz complexa e os meios seletivos geralmente são avaliados em sistemas-modelo, com culturas puras, o que pode comprometer o resultado final. A variedade de resultados e de eficiência dos meios seletivos pode estar relacionada ao uso de diferentes cepas nos experimentos.

4. CONCLUSÕES

No presente trabalho, o meio efetivamente seletivo para contagem de *L. acidophilus* em queijo Prato probiótico foi o MRSS incubado a 45°C por 72 horas em anaerobiose, onde não houve desenvolvimento de *Lactococcus lactis*.

A contagem efetivamente seletiva de *Lactococcus lactis* em queijo Prato probiótico foi conseguida com o meio M17 adicionado de lactose e incubado a 30°C em aerobiose, que apresentou altas contagens deste micro-organismo, sem desenvolvimento de *L. acidophilus*.

Para a obtenção de resultados seguros na contagem seletiva de micro-organismos probióticos em produtos lácteos fermentados é necessário avaliar diferentes metodologias, tanto para o produto em estudo como para as culturas puras, uma vez que a presença de diferentes micro-organismos e diferentes cepas pode comprometer os resultados, e, conseqüentemente, levar a conclusões equivocadas sobre a presença de probióticos em produtos lácteos.

5. REFERENCIAS

CHRISTIAN HANSEN (Boletim Técnico). Enumeration of *L. acidophilus*, in fermented milk products – Guidelines. **Technical bulletin P-10 - *L.acidophilus*** enumeration, nov. 2007.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 130-135, 1960.

IDF. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Fermented and non-fermented milk products - Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus* - culture media. **Bulletin of the IDF**, n. 306, p. 23-33, 1995.

KARIMI, R.; MORTAZAVIAN, A. M.; AMIRI-RIGI, A. Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese. **Food Microbiology**, v. 29, p. 1-9, 2012.

KASIMOGLU, A.; GÖNCÜOĞLU, M.; AKGÜN, S. Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. **International Dairy Journal**, v. 14, p.1067-1073, 2004.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N. P. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 446-456, 2006.

OBERG, C. J.; MOYES, L. V.; DOMEK, M. J.; BROTHERSEN, C.; McMAHON, D. J. Survival of probiotic adjunct cultures in cheese and challenges in their enumeration using selective media. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2220-2230, 2011.

O'FLAHERTY, S.; KLAENHAMMER, T. R. The role and potential of probiotic bacteria in the gut, and the communication between gut microflora and gut/host. **International Dairy Journal** v. 20, p.262–268, 2010.

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

TERZAGHI, B.E., SANDINE, W.E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. **Applied Microbiology**, v. 29, p. 807-813, 1975.

VAN DE CASTEELE, S., VANHEUVERZWIJN, T., RUYSSSEN, T., VAN ASSCHE, P., SWINGS, J. AND HUYS, G. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. **International Dairy Journal**, v.16, p.1470-1476. 2006.

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

VINDEROLA, G. C.; GONZÁLES DE LOS REYES-GAVILAN, C.; REINHEIMER, J. Probiotics and prebiotics in fermented dairy products. In: **Innovation in Food Engineering: New Techniques and Products**. PASSOS, M. L.; RIBEIRO, C. P. (Ed). Boca Raton: CRC Press, 2010. 705 p.

CAPÍTULO 3

MICROENCAPSULAÇÃO DE *Lactobacillus acidophilus* LA5 POR DIFERENTES TÉCNICAS

CAPÍTULO 3 - MICROENCAPSULAÇÃO DE *Lactobacillus acidophilus* La5 POR DIFERENTES TÉCNICAS

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar se o recobrimento de microcápsulas de pectina contendo *Lactobacillus acidophilus*, com proteína de soro tratada ou não termicamente, afeta a viabilidade do probiótico quando exposto às condições que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal. As microcápsulas foram produzidas por gelificação iônica e recobertas por coacervação complexa e foram avaliadas quanto a morfologia, tamanho médio, teor de umidade e proteína e a viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* La5. Adicionalmente, foi feita a avaliação da morfologia, da solubilidade da proteína adsorvida nas microcápsulas e da viabilidade do micro-organismo probiótico após a exposição às condições gastrointestinais simuladas a pH 1,2 e 3,0 e solução de bile 0,5% a pH 7,0. As microcápsulas não apresentaram diferença significativa em relação ao tamanho e quanto ao teor de proteína adsorvida sobre as partículas no caso das microcápsulas recobertas com concentrado proteico de soro tratado ou não termicamente. Todas as micropartículas apresentaram alto teor de umidade (acima de 92%), porém, as microcápsulas recobertas com proteína de soro diferiram significativamente das demais, apresentando menor teor de umidade. Independente do teor proteico ou da umidade, as microcápsulas recém-produzidas apresentaram morfologia semelhante, com formato esférico, e micro-organismos distribuídos por toda a estrutura de forma homogênea. A microencapsulação foi realizada com sucesso, sem perdas da viabilidade do probiótico durante o processo, uma vez que a viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* La5 foi alta e sem diferença significativa em todas as microcápsulas, em torno de 8,3 log UFC/g. As microcápsulas de pectina expostas às condições gastrointestinais simuladas em pH 1,2 e 3,0 mantiveram-se íntegras durante toda a simulação da passagem ao trato gastrointestinal, mesmo após 300 min. em pH 7,0 e solução de bile 0,5%. As microcápsulas recobertas com proteína de soro, tratado ou não termicamente se mantiveram íntegras durante 120 minutos de exposição ao suco gástrico artificial nos dois pH, 1,2 e 3,0. Entretanto, após 300 minutos de exposição a suco intestinal artificial em pH 7,0 ou solução de bile 0,5 % se romperam, possibilitando a liberação micro-organismo probiótico. A solubilidade proteica das

microcápsulas recobertas com proteína de soro aumentou significativamente ao longo do tempo de exposição em ambas as condições de pH, entretanto, a porcentagem de proteína solubilizada no pH 3,0, foi, em média 85,02% menor do que no pH 1,2. A microencapsulação do *Lactobacillus acidophilus* La5 não conferiu proteção ao micro-organismo exposto a pH 1,2 e à bile. Já em pH 3,0, a redução na viabilidade do micro-organismo microencapsulado foi menor do que a do micro-organismo livre. As microcápsulas recobertas com proteína do soro, por sua vez, não conferiram proteção adicional ao micro-organismo quando exposto às mesmas condições.

1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos probióticos para consumo humano tem sido alvo de grande interesse das indústrias de alimentos devido aos efeitos benéficos à saúde relacionados à sua ingestão. Para exercerem tais efeitos, os probióticos devem sobreviver às condições do trato gástrico e alcançarem e colonizarem o intestino (GBASSI et al., 2011).

Um dos principais requisitos que os micro-organismos probióticos devem cumprir quando adicionados a produtos, é que devem permanecer viáveis, em quantidade suficientemente alta, desde a inoculação, passando pelo armazenamento do produto, e durante a digestão pelo trato gastrointestinal, chegando ativos aos seus sítios de ação no intestino, para garantir sua funcionalidade (DOHERTY et al., 2011; MADUREIRA et al., 2011; HEIDEBACH et al., 2012).

Novas tecnologias têm sido propostas para manter a viabilidade dos micro-organismos probióticos durante o processamento, armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal e, entre elas, a microencapsulação tem se mostrado promissora. O objetivo da microencapsulação do probiótico é proteger os micro-organismos do meio adverso durante o processamento, armazenamento e consumo do produto ao qual foi adicionado, viabilizando sua chegada ao intestino na concentração mínima exigida para exercer seu efeito (SHAH, 2000; KAILASAPATHY, 2002, 2006; KRASAEKOOPT et al., 2003). Uma vez no ambiente intestinal a microcápsula deve se romper, por ação

mecânica, química ou por biodegradação, permitindo a liberação do micro-organismo probiótico no intestino.

Diversos estudos têm avaliado a proteção conferida pela microencapsulação aos micro-organismos probióticos, os quais, no geral, indicam que na forma encapsulada os micro-organismos são protegidos de condições adversas, mantendo maior estabilidade durante a estocagem e a passagem pelo trato gastrointestinal em relação aos mesmos livres (KRASAEKOOPT et al., 2003). Entretanto, a diversidade de parâmetros estudados simultaneamente dificulta a identificação da melhor combinação de material encapsulante e do melhor método de encapsulação na preservação do micro-organismo probiótico (LISERRE et al., 2007).

O objetivo do trabalho foi avaliar se o recobrimento de microcápsulas de pectina contendo *Lactobacillus acidophilus*, com proteína de soro tratada ou não termicamente, afeta a viabilidade do probiótico quando exposto às condições que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O esquema geral do experimento é apresentado na Figura 1 e consistiu da microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* La5 em três diferentes tipos de microcápsulas: (1) microcápsulas de pectina obtidas por gelificação iônica; (2) microcápsulas de pectina obtidas por gelificação iônica recoberta por coacervação complexa com proteína de soro do leite; (3) microcápsulas de pectina obtidas por gelificação iônica recoberta por coacervação complexa com proteína de soro do leite tratado termicamente (85°C/15 min.). As microcápsulas recém-produzidas foram avaliadas quanto às características físico-químicas e morfológicas e à viabilidade do probiótico. Adicionalmente, foi feita a avaliação físico-química, morfológica e de viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* após a exposição às condições gastrointestinais simuladas a pH 1,2 e 3,0 e solução de bile 0,5% a pH 7,0. Os materiais utilizados, bem como as metodologias de preparo e avaliação das microcápsulas são descritas a seguir.

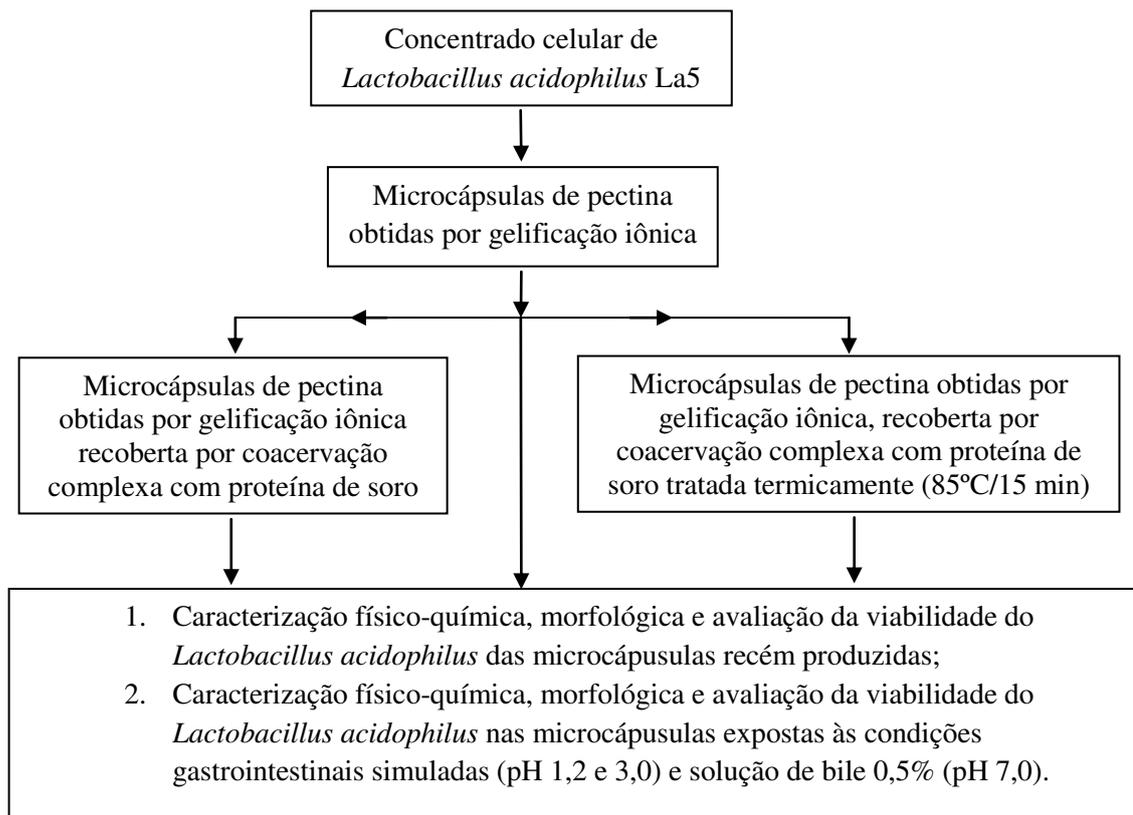


Figura 1: Esquema geral do trabalho.

2.1. Materiais

Os materiais utilizados foram *Lactobacillus acidophilus* La5 (Christian Hansen Ind. e Com. - Valinhos, Brasil), Pectina cítrica GENU[®] de baixo teor de esterificação amidada (CPKelco - Limeira, Brasil), Concentrado Proteico de Soro (Lacprodan 80% - Arla Foods Ingredients – Denmark). Também foram utilizados enzimas mucina (M1778), pepsina (P7012), pancreatina (P1625) e bile (B3883) da Sigma-Aldrich Co., ágar MRS (Difco – BD, USA), e manteiga sem sal (Laticínios Aviação, São Sebastião do Paraíso, Brasil).

2.2. Preparo do concentrado celular de *Lactobacillus acidophilus* La5 utilizado na microencapsulação

Todo o procedimento foi realizado em ambiente asséptico, em câmara de fluxo laminar. Cultura estoque de *Lactobacillus acidophilus* La5 congelada foi reativada em

caldo MRS (2% v/v) por duas vezes consecutivas, a 37°C por 15 horas. A cultura reativada foi centrifugada a 7.974 g por 10 minutos a 4°C (Centrífuga Sorvall Instruments RC5C – DUPONT), em tubos de polipropileno esterilizados. O concentrado de células obtido após a centrifugação foi resuspenso em água peptonada (0,1% v/v) e centrifugado novamente nas mesmas condições, seguido de ressuspensão em água peptonada para obtenção de um concentrado de células com 10^9 - 10^{10} UFC/mL. Um concentrado celular foi preparado para cada experimento e a viabilidade foi avaliada por plaqueamento em profundidade em ágar MRS, com incubação a 37°C por 72 horas em jarras de anaerobiose usando gerador de anaerobiose GasPak (DE MAN et al., 1960).

2.3. Produção de microcápsulas contendo *Lactobacillus acidophilus* La5

A microencapsulação do *Lactobacillus acidophilus* La5 foi realizada através da combinação de técnicas de gelificação iônica e coacervação complexa, conforme descrito por Ribeiro (2011) e Gerez et al. (2012). Inicialmente, solução de pectina cítrica de baixo grau de esterificação amidada (2 % p/p) foi preparada e o pH foi ajustado para 4,0. À solução de pectina adicionaram-se 2 % (p/p) de manteiga sem sal derretida, e a mistura foi submetida à agitação (Ultraturrax - IKA, Works do Brasil) a 14.000 rpm/5min para formar uma emulsão. À emulsão adicionou-se o concentrado de células de *L. acidophilus* La5 contendo aproximadamente 10^{10} UFC/mL, agitando-se novamente em ultraturrax (6.000 rpm/1 min.) para incorporação das células à emulsão. A emulsão assim obtida foi mantida sob agitação magnética (410 rpm) a 40°C e, com auxílio de uma bomba peristáltica com pressão de ar de 0,15 kgf/cm², foi aspergida através de um bico atomizador duplo fluido (diâmetro de 1 mm) em uma solução de cloreto de cálcio (2 % p/v) em pH 4,0. No momento do contato da emulsão com a solução de cloreto de cálcio houve a formação das microcápsulas, que foram mantidas sob agitação constante (410 rpm) por 30 minutos na solução de CaCl₂ para completa gelificação. Após esse período, as microcápsulas foram removidas, drenadas (peneira com poro de 0,125 mm) e lavadas com água deionizada com pH 4,0, obtendo-se assim as microcápsulas de pectina por gelificação iônica que serão identificadas no texto como Microcápsulas_{PEC}. As Microcápsulas_{PEC} foram divididas em duas porções: uma delas foi colocada em solução de Concentrado Proteico de Soro (CPS) (4% p/v) em pH 4,0 e a

outra em solução de CPS (4 % p/v) em pH 4,0, previamente tratada termicamente a 80°C/15 minutos, em banho térmico sob agitação. Ambas as microcápsulas foram mantidas nessas soluções por 30 minutos, sob agitação (410 rpm), para que ocorresse a coacervação complexa, ou seja, a interação eletrostática entre a proteína do soro e a pectina, de forma a propiciar o recobrimento das partículas de pectina com as proteínas do soro tratadas ou não termicamente. Decorrido este tempo, as microcápsulas foram removidas da solução e novamente lavadas com água deionizada pH 4,0. As microcápsulas de pectina obtidas por gelificação iônica recobertas com proteína de soro do leite, não submetido e submetido ao tratamento térmico, serão identificadas no texto como microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro (Microcápsulas_{PEC+PS}) e microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro após tratamento térmico (Microcápsulas_{PEC+PS-TT}), respectivamente.

A microencapsulação do *Lactobacillus acidophilus* La5 foi realizada em ambiente asséptico e todos os materiais de laboratório e as soluções utilizados para a produção das microcápsulas, exceto a solução de pectina, foram previamente esterilizados a 121°C/15 minutos. A solução de pectina foi filtrada em filtro microbiológico (AP20 04700- Millipore) com poros de 0,8 a 8µm.

2.4. Caracterização físico-química e avaliação da viabilidade do probiótico nas microcápsulas recém-produzidas

2.4.1. Composição físico-química

A caracterização físico-química das microcápsulas recém-produzidas foi feita através da avaliação do tamanho médio e da distribuição de tamanho das partículas e dos teores de proteína e umidade.

A avaliação do diâmetro médio e sua distribuição de tamanho foram realizadas utilizando-se o analisador de tamanho de partículas Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltda). A morfologia foi observada em microscópio óptico (Jenaval) utilizando objetiva de 25x e optovar de 1,25x com captação de imagens por câmera digital, com a utilização do software EDN-2 – Microscopy Image Processing System.

Os teores de umidade e proteína das micropartículas foram determinados segundo metodologias descritas pela AOAC (2006). A umidade foi determinada através de secagem em estufa a 105°C por 15 horas. O teor de nitrogênio total das partículas e da pectina utilizada na sua produção foi determinado por Kjeldahl (AOAC, 2006). Para o cálculo do nitrogênio referente à adsorção da proteína do soro na micropartícula, o teor de nitrogênio presente na pectina foi descontado do teor de nitrogênio total das partículas. O teor de proteína adsorvida na partícula foi calculado multiplicando-se o nitrogênio referente à adsorção da proteína do soro por 6,38. Os resultados da porcentagem de proteína adsorvida nas micropartículas foram expressos em base seca.

2.4.2. Avaliação da viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La5 nas microcápsulas recém produzidas

A viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* La5 foi determinada por meio da contagem de células viáveis, tanto no concentrado celular quanto nas microcápsulas. Para o rompimento das microcápsulas e liberação dos micro-organismos, as mesmas foram colocadas em solução de citrato de sódio (2 % p/v) em pH 7,0 sob vigorosa agitação por 5 minutos (GROSSO e FÁVARO-TRINDADE, 2004; KRASAEKOOPT et al., 2004). Em seguida, foram realizadas diluições sucessivas em água peptonada (0,1 % p/v), e plaqueamento em profundidade em placas de Petri utilizando ágar MRS. As placas foram incubadas a 37 °C por 72 horas em jarra anaeróbia, utilizando-se gerador de anaerobiose, com posterior contagem da população de micro-organismos probióticos (DE MAN et al., 1960).

2.5. Caracterização físico-química e avaliação da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* La5 nas microcápsulas expostas a condições gastrointestinais simuladas

Durante a exposição às condições que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal as partículas obtidas dos três tratamentos (Microcápsulas_{PEC}, Microcápsulas_{PEC+PS} e Microcápsulas_{PEC+PS-TT}) foram avaliadas quanto a morfologia e solubilidade da proteína adsorvida à partícula. Simultaneamente, nas mesmas condições imitativas do trato gastrointestinal, em pH 1,2 e 3,0 e na presença de bile (0,5% e pH 7,0), avaliou-se a viabilidade celular do *Lactobacillus acidophilus*. Para efeito de

comparação, a viabilidade celular do concentrado de *Lactobacillus acidophilus* foi também avaliada nas mesmas condições. Os materiais utilizados, bem como as metodologias de preparo e avaliação das microcápsulas são descritas a seguir.

2.5.1. Preparo do suco gástrico e intestinal artificial e da solução de bile

Os sucos gástrico e intestinal artificiais foram preparados segundo Mozzi et al. (2009) e Picot e Lacroix (2004), com modificações. O suco gástrico artificial (SGA) foi preparado com cloreto de potássio (1,12 g/L), cloreto de sódio (2,0 g/L), cloreto de cálcio (0,11 g/L) e fosfato de potássio monobásico (0,4 g/L), sendo em seguida esterilizado a 121°C/15 min. Imediatamente antes da sua utilização, o SGA foi adicionado de mucina (3,5 g/L) e pepsina (0,26 g/L) e o pH foi ajustado para 1,2 ou 3,0 com HCl 1N. O suco intestinal artificial (SIA) foi preparado através da adição de solução de pancreatina ao SGA para obtenção da concentração final de 1,95g/L e em seguida o pH foi ajustado para 7,0 com adição de NaHCO₃ 1N. A solução de bile foi preparada em água na concentração de 0,5%, foi esterilizada (121°C/15 min) e seu pH ajustado para 7,0.

2.5.2. Caracterização físico-química das micropartículas expostas à simulação das condições gastrointestinais

Para caracterização físico-química das micropartículas expostas à simulação das condições gastrointestinais, 3 g de cada uma das diferentes microcápsulas (Microcápsulas_{PEC}, Microcápsulas_{PEC+PS} e Microcápsulas_{PEC+PS-TT}) foram adicionados separadamente em tubos contendo 30 mL de suco gástrico artificial (SGA) em pH 1,2 ou 3,0, que foram incubados a 37°C sob agitação em banho metabólico tipo Dubnoff, conforme esquema apresentado na Figura 2. Para cada um dos pontos de análise (0, 60, 120 e 420 minutos) foi conduzida a análise de um branco, utilizando-se somente o SGA. Imediatamente após a adição das microcápsulas ao SGA (0 min), um dos tubos contendo microcápsulas foi retirado do banho e utilizado para avaliar a morfologia das partículas. Os outros dois, um branco e o outro contendo microcápsulas, foram utilizados para avaliação da solubilidade proteica. Após 60 e 120 minutos, outros tubos foram retirados do banho e repetiram-se as determinações analíticas. Em seguida, para a produção do suco intestinal artificial (SIA), aos três tubos restantes adicionou-se

solução de pancreatina (concentração final de 1,95g/L) e o pH foi ajustado para 7,0. Os tubos foram mantidos no banho por mais 300 minutos, perfazendo um total de 420 min., e, em seguida foram retirados para as mesmas determinações analíticas. O experimento completo, conforme esquematizado na Figura 2, foi repetido três vezes para cada uma das três diferentes micropartículas (Microcápsulas_{PEC}, Microcápsulas_{PEC+PS} e Microcápsulas_{PEC+PS-TT}) em pH 1,2 e 3,0, perfazendo um total de 18 experimentos.

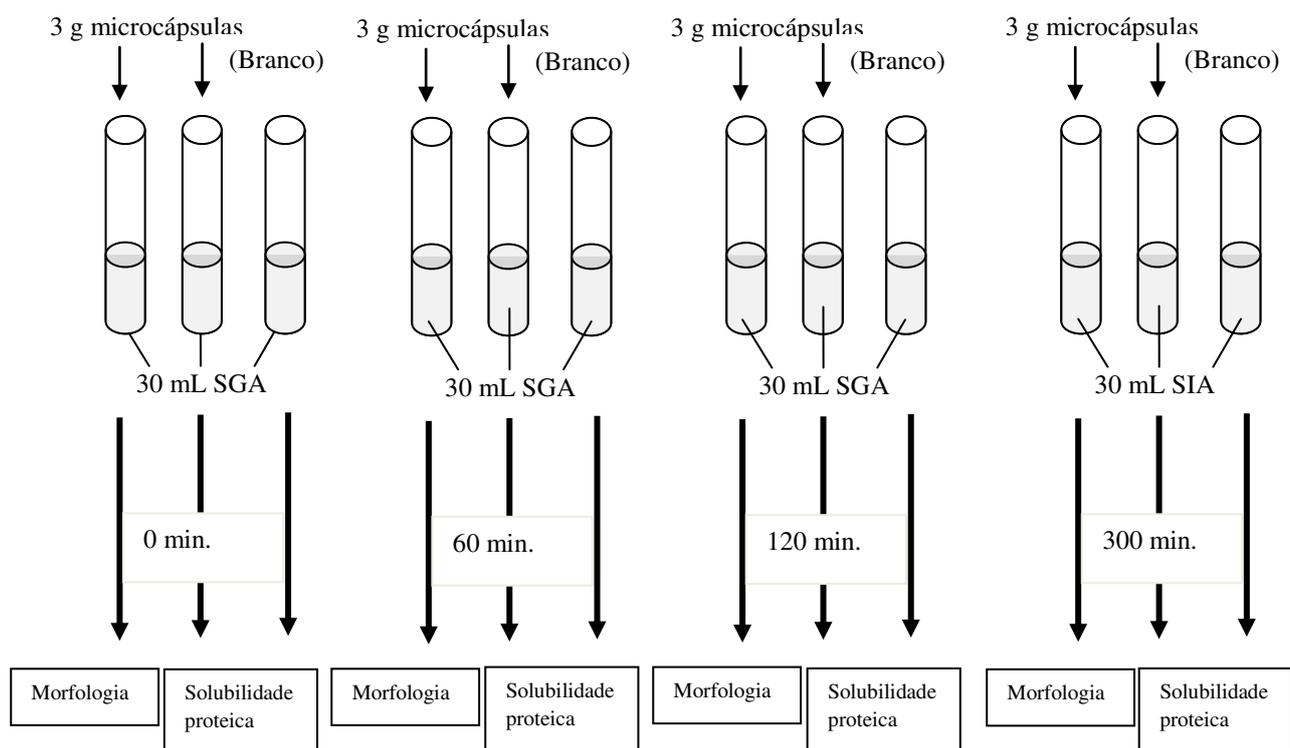


Figura 2 - Representação esquemática do experimento para caracterização físico-química das micropartículas expostas à simulação das condições gastrointestinais. O experimento foi repetido nos pH 1,2 e 3,0 para suco gástrico artificial (SGA) e no pH 7,0 para o suco intestinal artificial (SIA).

Para avaliação da solubilidade proteica, os tubos foram colocados em banho de gelo por 15 minutos e em seguida centrifugados (Centrífuga Sorvall Instruments RC5C – DUPONT) a 34.540 g por 10 minutos. O sobrenadante foi separado e utilizado para quantificação do teor de nitrogênio total por Kjeldahl (AOAC, 2006). O branco, sem adição de micropartículas, foi submetido ao mesmo tratamento das amostras e também

avaliado quanto ao teor de nitrogênio por Kjeldahl. Para o cálculo da solubilidade proteica das partículas expostas à simulação das condições gastrointestinais o teor de nitrogênio do branco foi descontado dos valores de nitrogênio obtidos nas amostras. O teor de proteína foi calculado multiplicando-se o teor de nitrogênio referente à solubilidade da amostra por 6,38. A solubilidade de proteína foi expressa em porcentagem em base seca.

A avaliação da morfologia das partículas após 0, 60 e 120 minutos de exposição ao SGA e 300 minutos ao SIA foram realizadas conforme metodologias descritas anteriormente (item 2.4.1).

2.5.3. Avaliação da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* La5 durante simulação das condições gastrointestinais

A avaliação da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* durante simulação das condições gastrointestinais foi realizada com metodologia adaptada de Rao et al. (1989), Krasaekoopt et al. (2004) e Gerez et al. (2012). Inicialmente, 3 g de cada uma das diferentes microcápsulas (Microcápsulas_{PEC}, Microcápsulas_{PEC+PS} e Microcápsulas_{PEC+PS-TT}) ou 3 mL do concentrado celular foram adicionados em tubos de ensaio contendo 30 mL de suco gástrico artificial (SGA) que foram incubados a 37°C sob agitação em banho metabólico tipo Dubnoff, conforme esquema apresentado na Figura 3. Imediatamente após a adição das microcápsulas ao SGA (0 min), e após 60 e 120 minutos de exposição ao SGA, uma alíquota de 5 mL foi retirada para avaliação da viabilidade do probiótico. Após a retirada da alíquota aos 120 minutos de exposição ao SGA, adicionou-se ao tubo a solução de pancreatina (concentração final de 1,95g/L) e o pH foi ajustado para 7,0. Os tubos foram mantidos no banho por mais 300 minutos, e, em seguida, nova alíquota de 5 mL foi retirada para análise da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus*. O experimento completo, conforme esquematizado na Figura 3, foi repetido três vezes para cada uma das três diferentes micropartículas (Microcápsulas_{PEC}, Microcápsulas_{PEC+PS} e Microcápsulas_{PEC+PS-TT}) e também para o micro-organismo livre (concentrado celular) em pH 1,2 e 3,0, perfazendo um total de 24 experimentos.

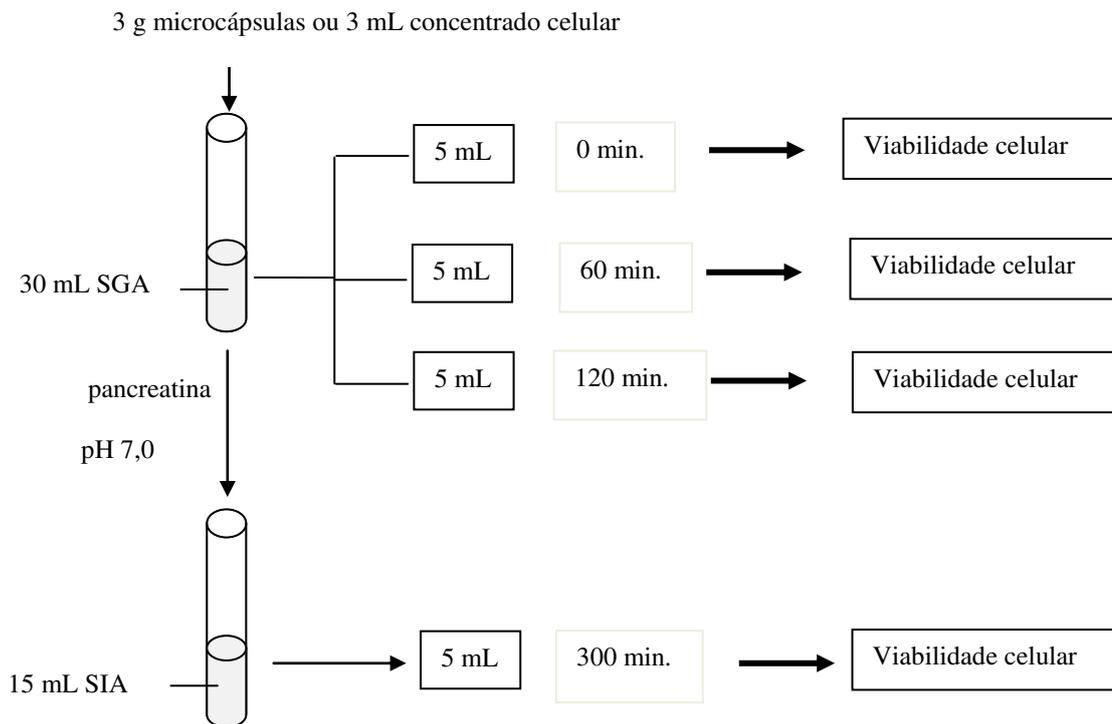


Figura 3 – Representação esquemática do experimento para avaliação da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* durante simulação das condições gastrointestinais. O experimento foi repetido nos pH 1,2 e 3,0 para suco gástrico artificial (SGA) e no pH 7,0 para o suco intestinal artificial (SIA).

Para avaliação da resistência à bile, 3 g de cada microcápsula ou 3 mL do concentrado celular foram adicionados a tubos contendo 30 mL de solução de bile 0,5%, com pH ajustado para 7,0 (Figura 4). Após 0, 60 e 300 minutos de exposição à bile alíquotas foram retiradas para análise da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus*. O experimento completo com exposição à bile 0,5%, conforme esquematizado na Figura 4, foi repetido três vezes para cada uma das três diferentes micropartículas (Microcápsulas_{PEC}, Microcápsulas_{PEC+PS} e Microcápsulas_{PEC+PS-TT}) e para o micro-organismo livre (concentrado celular), perfazendo um total de 12 experimentos.

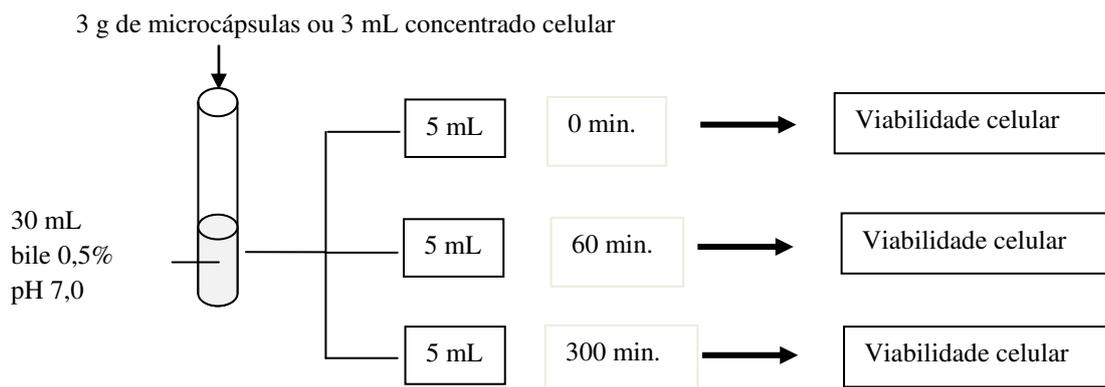


Figura 4 – Representação esquemática do experimento para avaliação da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* durante a exposição à solução de bile 0,5% em pH 7,0.

Para avaliação da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus*, à alíquota de 5 mL retirada dos tubos, adicionou-se NaHCO_3 1N para neutralização do pH. Para rompimento das cápsulas e liberação dos micro-organismos, 1 mL desta solução foi transferido para um tubo de ensaio contendo 9 mL citrato de sódio (2 % p/v) pH 7,0, o qual foi submetido a vigorosa agitação por 5 minutos. Seguiu-se a diluição em água peptonada 0,1% e plaqueamento em profundidade utilizando ágar MRS, com incubação a 37°C em condições de anaerobiose. A avaliação da viabilidade do micro-organismo após a exposição à bile seguiu o mesmo procedimento de rompimento das microcápsulas, diluição e plaqueamento, não sendo necessário realizar a neutralização da amostra.

2.6. Delineamento experimental e análise estatística

O efeito da técnica de microencapsulação do *Lactobacillus acidophilus* sobre o tamanho médio, os teores de proteína e umidade das cápsulas e a viabilidade do probiótico foi avaliado por Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey no nível de 5% de significância.

Um delineamento experimental de parcelas subdivididas, em esquema fatorial 2 x 3 foi utilizado para avaliar o efeito do tipo de microcápsulas (2 níveis de variação) e do tempo de exposição ao suco gastrointestinal artificial (3 níveis de variação) sobre a solubilidade proteica. A análise estatística foi realizada separadamente para cada pH

estudado (1,2 e 3,0), através de ANOVA e teste de Tukey no nível de 5% de significância.

O efeito do tempo de exposição ao suco gástrico e intestinal artificiais e à bile sobre a viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* livre e microencapsulado foi avaliado por Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey no nível de 5% de significância. Quando exposto ao SGA, a análise estatística foi realizada separadamente para cada pH estudado (1,2 e 3,0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização físico-química e avaliação da viabilidade do probiótico nas microcápsulas recém-produzidas

A composição físico-química das microcápsulas recém produzidas é apresentada na Tabela 1. Observa-se que as microcápsulas não apresentaram diferença significativa em relação ao tamanho médio e quanto ao teor de proteína adsorvida sobre as partículas, no caso das microcápsulas recobertas com proteína de soro. Estes resultados evidenciam que o tratamento térmico do soro (85°C/15 min.), com a conseqüente desnaturação de suas proteínas que mudam sua conformação expondo diferentes grupos de reação (BRITTEN e GIROUX, 2001; CONSIDINE et al., 2007; FLORIS et al., 2008), não favoreceu nem desfavoreceu a interação entre as proteínas e a pectina durante o estabelecimento de uma camada proteica na superfície da partícula. A adsorção de proteínas sobre a superfície da partícula, que depende principalmente da sua carga superficial, se dá através de interação Van der Waals, pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas (SCHMITT et al., 1998; ROACH et al., 2005). Embora seja conhecido que a quantidade de cargas livres disponível na partícula possa influenciar diretamente a adsorção na sua superfície, e tenha sido demonstrado que micropartículas de alginato com maior potencial zeta apresentaram maior adsorção de quitosana na sua superfície (XIE et al., 2009), no presente estudo não foi possível avaliar a carga superficial das partículas. As partículas obtidas neste trabalho, possivelmente em função do seu diâmetro médio, apresentavam sedimentação muito rápida, inviabilizando a avaliação do

seu potencial zeta através do Zetasizer Modelo Nano-Z (Malvern Instrumentos, Malvern, Worcestershire, U.K.).

Todas as micropartículas apresentaram alto teor de umidade (Tabela 1), o que é característico para partículas obtidas por gelificação iônica (MUKAI-CORREA et al., 2004). Entretanto, enquanto as Microcápsulas_{PEC} e Microcápsulas_{PEC+PS-TT} não apresentaram diferença entre si em relação ao teor de umidade, as Microcápsulas_{PEC+PS} que apresentaram o menor teor de umidade ($92,8 \pm 1,05\%$), diferiram significativamente das demais. É possível que a maior capacidade de ligação com a água das proteínas do soro desnaturadas, após tratamento térmico a $85^\circ\text{C}/15$ minutos (BRITTEN e GIROUX, 2001) tenha favorecido a manutenção da umidade das Microcápsulas_{PEC+PS-TT} quando comparadas às Microcápsulas_{PEC}. Por outro lado, as interações entre as proteínas do soro não tratadas termicamente e a pectina podem ter se dado com liberação de moléculas de água da superfície da partícula, resultando em micropartículas de menor umidade.

Tabela 1 - Composição físico-química das microcápsulas recém produzidas e viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (n = 3).

Caracterização	¹ Microcápsulas	² Microcápsulas	³ Microcápsulas	p
	PEC	PEC+PS	PEC+PS-TT	
Tamanho (μm)	$206,44 \pm 36,55^a$	$169,54 \pm 19,83^a$	$204,24 \pm 9,81^a$	0,131
Teor de proteína na matéria seca (%)	nd	$43,01 \pm 4,90^a$	$31,86 \pm 6,41^a$	0,060
Teor de umidade (%)	$95,11 \pm 0,27^a$	$92,80 \pm 1,05^b$	$96,28 \pm 0,67^a$	0,006
Viabilidade (log UFC/g)	$8,29 \pm 0,33^a$	$8,27 \pm 0,30^a$	$8,38 \pm 0,13^a$	0,474

¹Microcápsulas_{PEC}: Microcápsulas de pectina obtidas por gelificação iônica; ²Microcápsulas_{PEC+PS}: Microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro; ³Microcápsulas_{PEC+PS-TT}: Microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro após tratamento térmico. nd: não determinado. a, b – entre os tratamentos, letras minúsculas diferentes na mesma linha, apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Independente do teor proteico ou da umidade, as microcápsulas recém-produzidas apresentaram morfologia semelhante, com formato esférico, podendo-se observar que as gotículas de manteiga e os micro-organismos ficaram distribuídos por toda a estrutura de forma homogênea, conforme mostrado na Figura 5.

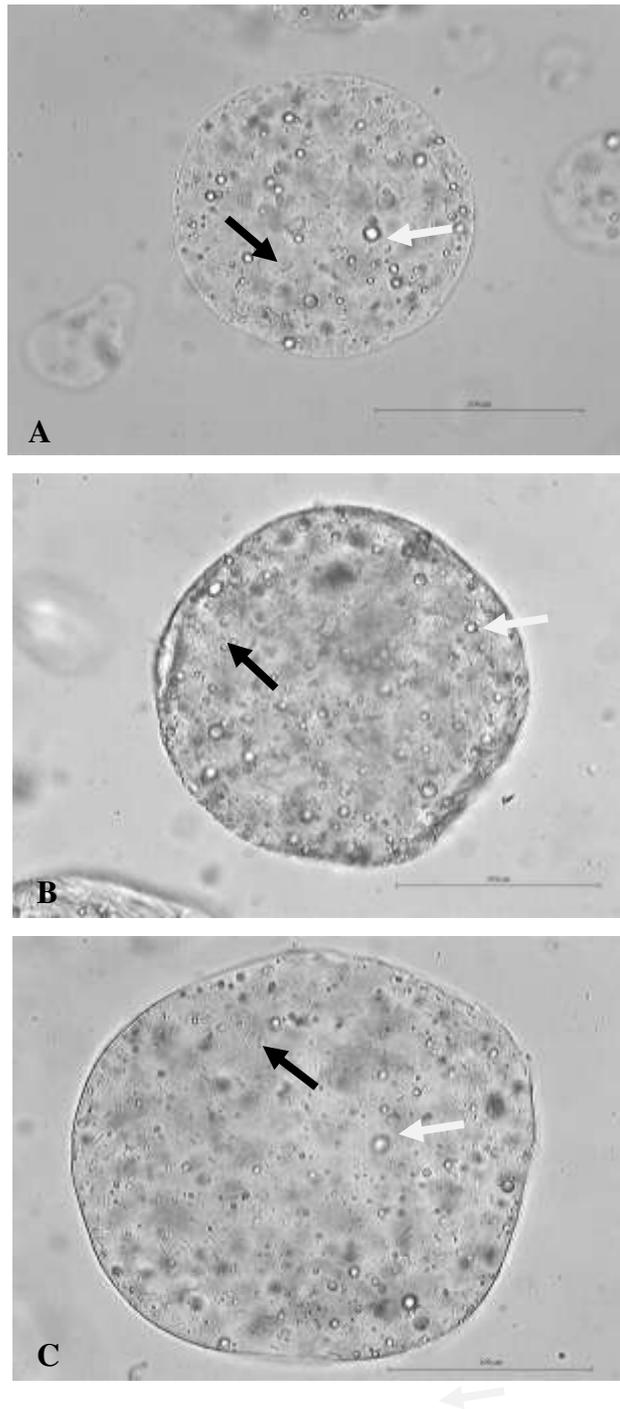


Figura 5 - Morfologia das micropartículas contendo *Lactobacillus acidophilus* recém produzidas, obtidas por microscopia óptica. **A:** Microcápsulas de pectina obtidas por gelificação iônica; **B:** Microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro; **C:** Microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro após tratamento térmico (85 °C/15 min.). Setas claras: gotículas de gordura; setas escuras: *Lactobacillus acidophilus*. Barra = 100µm.

Em relação à viabilidade do *Lactobacillus acidophilus*, observa-se na Tabela 1 que todas as microcápsulas apresentaram altas contagens do probiótico, em torno de 8,3 log UFC/g, que não diferiram significativamente entre si. O concentrado celular utilizado na produção das microcápsulas apresentou contagem média de $9,86 \pm 0,61$ log UFC/mL. A diferença em relação à contagem obtida nas microcápsulas deve-se ao fator diluição, já que foi adicionada uma porção de 10 mL desse concentrado em 500 mL de emulsão de pectina e manteiga para a produção das microcápsulas. Este resultado evidencia que o processo de microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* por gelificação iônica, utilizando pectina como material de parede, recoberto ou não com proteína do soro tratada ou não termicamente foi realizado com sucesso, sem perdas da viabilidade do probiótico durante o processo de microencapsulação. As condições de encapsulação, que foi conduzida à temperatura ambiente, sem uso de solventes orgânicos e no pH 4, que favorecem a interação entre a pectina e as proteínas do soro, podem ter contribuído para a manutenção da viabilidade do micro-organismo durante sua microencapsulação pela associação destas duas técnicas. Além disso, a presença da gordura na emulsão tem sido também relacionada à maior manutenção da viabilidade do micro-organismo (PICOT e LACROIX, 2004; LAHTINEN et al., 2007).

3.2. Caracterização físico-química e avaliação da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* La5 nas microcápsulas expostas a condições gastrointestinais simuladas

3.2.1. Caracterização físico-química

A morfologia das Microcápsulas_{PEC} expostas às condições gastrointestinais simuladas é apresentada nas Figuras 6 e 7 em pH 1,2 e 3,0, respectivamente. Observa-se que em ambos os pH, as micropartículas mantiveram-se íntegras durante toda a simulação da passagem ao trato gastrointestinal, mesmo após 300 min. em pH 7,0. O rompimento das microcápsulas com consequente liberação dos micro-organismos probióticos no ambiente intestinal é desejável para que ocorra sua colonização no intestino e o micro-organismo seja capaz de conferir seus efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (BUDDINGTON, 2009). No caso da utilização de *Lactobacillus acidophilus*

sua liberação das microcápsulas deve ocorrer no intestino delgado, cujo pH é cerca de 6,5 (RAY, 2004; HAMMES e HERTEL, 2006; SOULIMAN et al., 2006).

O não rompimento das microcápsulas de pectina produzidas por gelificação iônica nas condições intestinais pode ser explicado pela resistência da pectina às enzimas presentes no trato gastrointestinal superior, a qual é digerida apenas pela microbiota presente no cólon (LIU et al., 2003). Isso sugere que este tipo de microcápsula (Microcápsulas_{PEC}) não é indicado para a veiculação de *Lactobacillus acidophilus*, pois a liberação do micro-organismo só ocorreria no cólon. Entretanto, outros micro-organismos probióticos como algumas espécies de *Bifidobacterium* poderiam ser indicados para esse tipo de microcápsula, já que são capazes de colonizar o cólon (RAY, 2004).

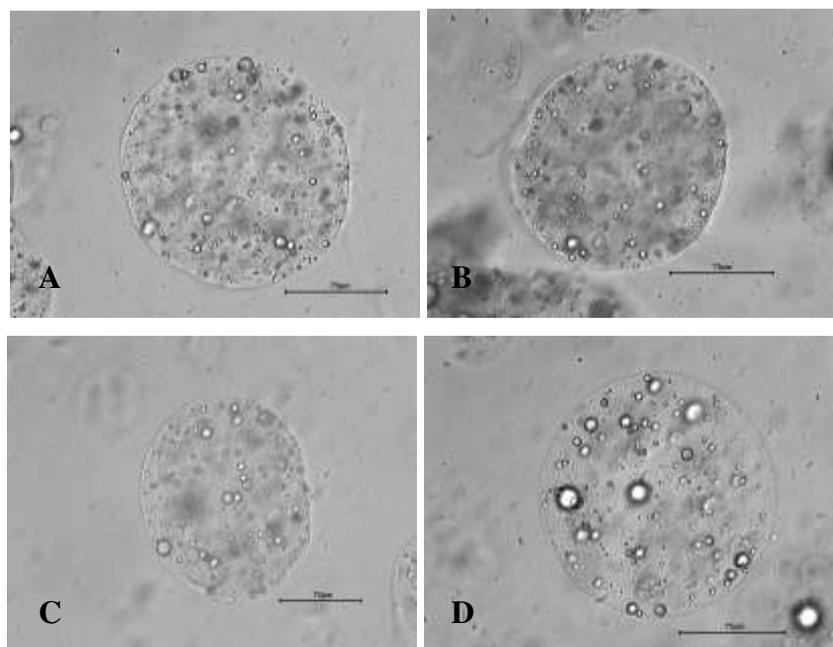


Figura 6 - Morfologia das microcápsulas de pectina obtidas por gelificação iônica durante exposição sequencial a suco gástrico artificial (SGA), em pH 1,2 por 120 min. e suco intestinal artificial (SIA), em pH 7,0 por mais 300 min. **A:** Imediatamente após a exposição ao SGA em pH 1,2; **B:** 60 min. de exposição ao SGA em pH 1,2; **C:** 120 min. de exposição ao SGA em pH 1,2; **D:** 300 min. de exposição ao SIA em pH 7,0. Barra = 75 μ m.

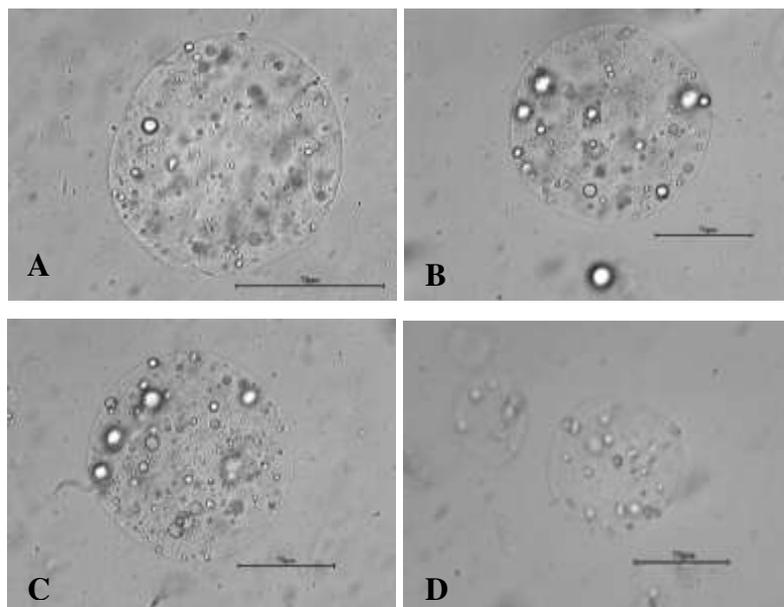


Figura 7 - Morfologia das microcápsulas de pectina obtidas por gelificação iônica durante exposição sequencial a suco gástrico artificial (SGA), em pH 3,0 por 120 min. e suco intestinal artificial (SIA), em pH 7,0 por mais 300 min. **A:** Imediatamente após a exposição ao SGA em pH 3,0; **B:** 60 min. de exposição ao SGA em pH 3,0; **C:** 120 min. de exposição ao SGA em pH 3,0; **D:** 300 min. de exposição ao SIA em pH 7,0. Barra = 75 μ m.

A morfologia das *Microcápsulas*_{PEC+PS} e *Microcápsulas*_{PEC+PS-TT} expostas às condições gastrointestinais simuladas é apresentada nas Figuras 8, 9, 10 e 11 em pH 1,2 e 3,0 respectivamente.

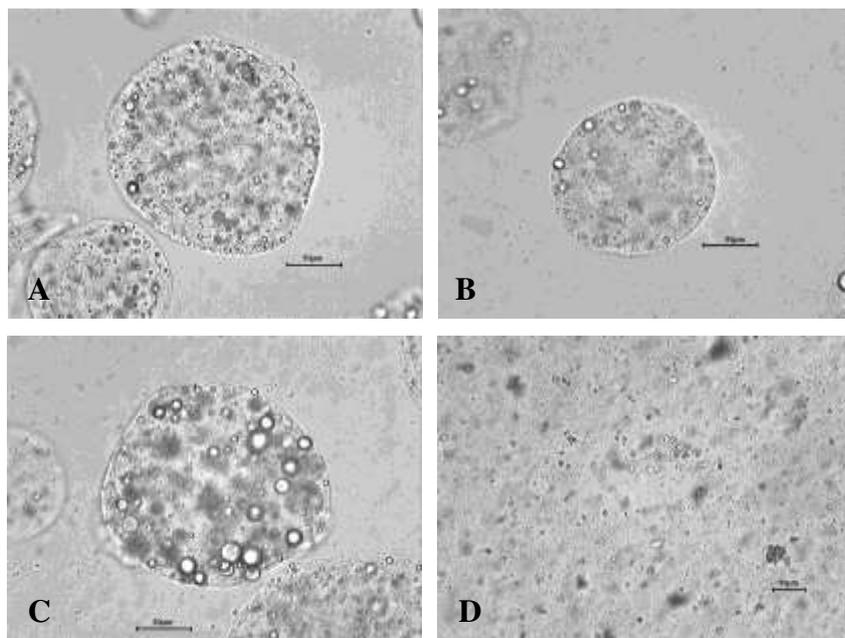


Figura 8 - Morfologia das microcápsulas de pectina obtidas por gelificação iônica recobertas com proteína de soro durante exposição sequencial a suco gástrico artificial (SGA), em pH 1,2 por 120 min. e suco intestinal artificial (SIA), em pH 7,0 por mais 300 min. **A:** Imediatamente após a exposição ao SGA em pH 1,2; **B:** 60 min. de exposição ao SGA em pH 1,2; **C:** 120 min. de exposição ao SGA em pH 1,2; **D:** 300 min. de exposição ao SIA em pH 7,0. Barra = 50µm.

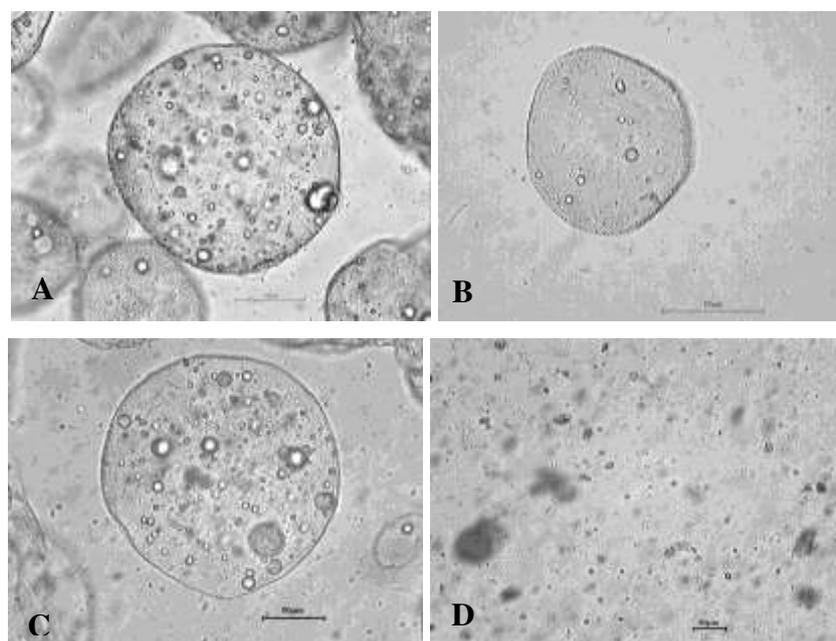


Figura 9 - Morfologia das microcápsulas de pectina obtidas por gelificação iônica recobertas com proteína de soro durante exposição sequencial a suco gástrico artificial (SGA), em pH 3,0 por 120 min. e suco intestinal artificial (SIA), em pH 7,0 por mais 300 min. **A:** Imediatamente após a exposição ao SGA em pH 3,0; **B:** 60 min. de exposição ao SGA em pH 3,0; **C:** 120 min. de exposição ao SGA em pH 3,0; **D:** 300 min. de exposição ao SIA em pH 7,0. Barra = 50µm.

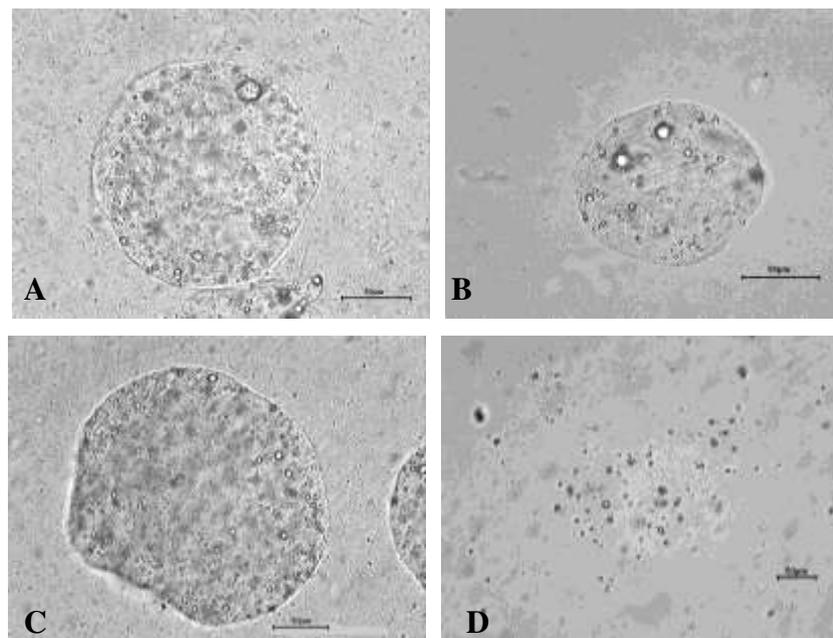


Figura 10 - Morfologia das microcápsulas de pectina obtidas por gelificação iônica recobertas com proteína de soro tratada termicamente durante exposição sequencial a suco gástrico artificial (SGA), em pH 1,2 por 120 min. e suco intestinal artificial (SIA), em pH 7,0 por mais 300 min. **A:** Imediatamente após a exposição ao SGA em pH 1,2; **B:** 60 min. de exposição ao SGA em pH 1,2; **C:** 120 min. de exposição ao SGA em pH 1,2; **D:** 300 min. de exposição ao SIA em pH 7,0. Barra = 50µm.

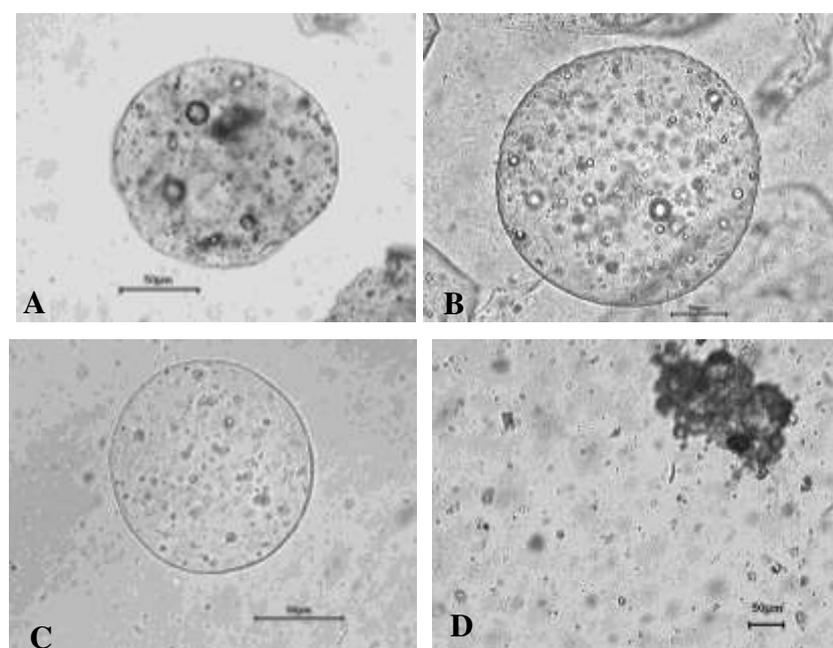


Figura 11 - Morfologia das microcápsulas de pectina obtidas por gelificação iônica recobertas com proteína de soro tratada termicamente durante exposição sequencial a suco gástrico artificial (SGA), em pH 3,0 por 120 min. e suco intestinal artificial (SIA), em pH 7,0 por mais 300 min. **A:** Imediatamente após a exposição ao SGA em pH 3,0; **B:** 60 min. de exposição ao SGA em pH 3,0; **C:** 120 min. de exposição ao SGA em pH 3,0; **D:** 300 min. de exposição ao SIA em pH 7,0. Barra = 50µm.

Observa-se nas Figuras 8 a 11 que microcápsulas recobertas com proteína de soro se mantiveram íntegras durante 120 minutos de exposição ao SGA em pH 1,2 e 3,0. Entretanto, após 300 minutos de exposição a SIA em pH 7,0, as microcápsulas recobertas com proteína de soro, tratado (Microcápsulas_{PEC+PS-TT}) ou não termicamente (Microcápsulas_{PEC+PS}) se romperam, possibilitando a liberação micro-organismo probiótico.

O rompimento das microcápsulas contendo proteína de soro em simulação das condições intestinais, também foi observado por Picot e Lacroix (2004), Gbassi et al. (2009, 2011) e Doherty et al. (2011). Acredita-se que no mais alto pH, quando as proteínas estão negativamente carregadas, a repulsão eletrostática na superfície proteica da partícula pode facilitar a proteólise pelas enzimas do trato gastrointestinal, causando o rompimento das microcápsulas (DOHERTY et al., 2011). O rompimento das micropartículas de pectina obtidas por gelificação iônica recobertas com proteínas do soro, tratadas ou não termicamente, sugere que a liberação do *Lactobacillus acidophilus* no intestino delgado pode ocorrer *in vivo*. Assim, as microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro seriam adequadas para a veiculação deste probiótico.

A Figura 12 apresenta a morfologia das Microcápsulas_{PEC}, Microcápsulas_{PEC+PS} e Microcápsulas_{PEC+PS-TT} após exposição à solução de bile 0,5% em pH 7,0, por 300 min. As microcápsulas de pectina se mantiveram íntegras durante todo o período de exposição, enquanto que as microcápsulas recobertas com proteína de soro se romperam imediatamente após a exposição à bile 0,5% em pH 7,0.

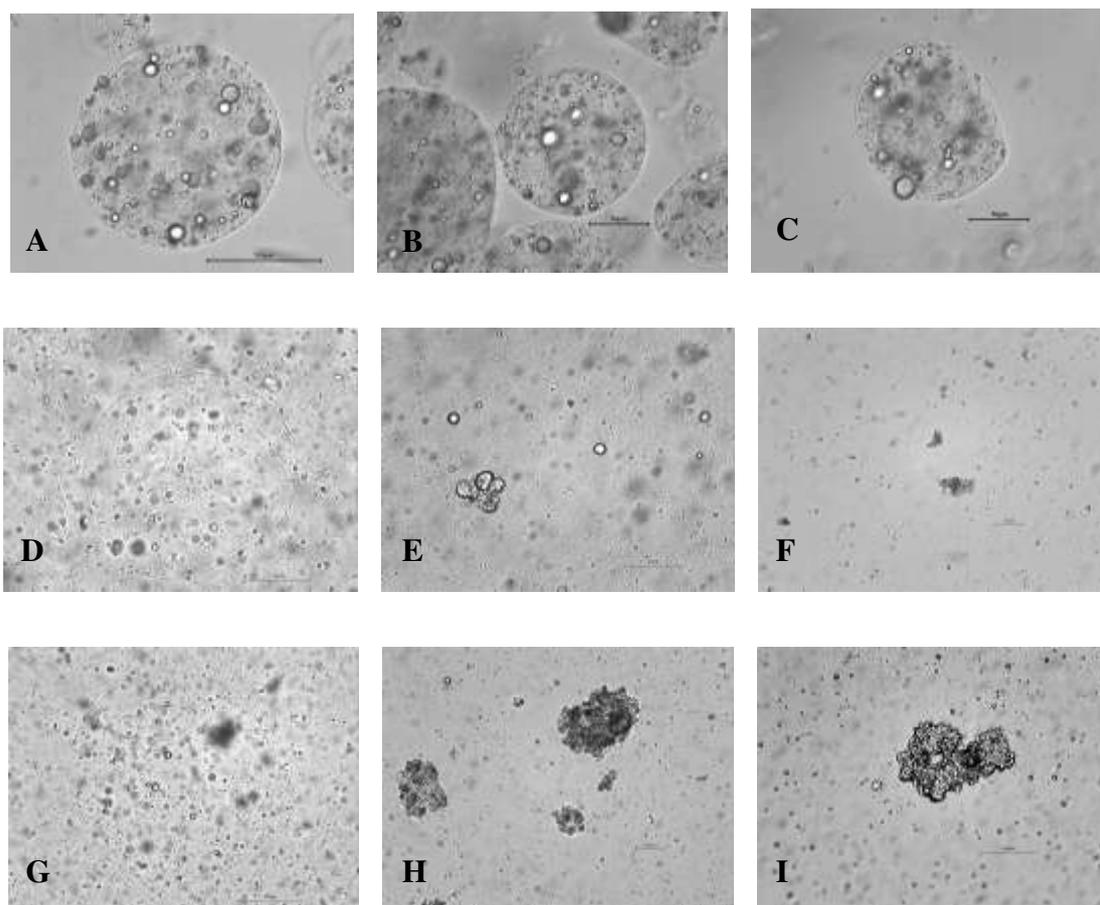


Figura 12 - Morfologia das microcápsulas durante exposição à solução de bile 0,5% em pH 7,0 por 300 min. A, B e C: Microcápsulas de pectina obtidas por gelificação iônica. (A) Imediatamente após a exposição à bile; (B) após 60 min. de exposição à bile; (C) após 120 min. de exposição à bile. D, E e F: Microcápsulas de pectina obtidas por gelificação iônica recobertas com proteínas do soro. (D) Imediatamente após a exposição à bile; (E) após 60 min. de exposição à bile; (F) após 300 min. de exposição a bile. G, H, I: Microcápsulas de pectina obtidas por gelificação iônica recobertas com proteína do soro tratada termicamente. (G) Imediatamente após a exposição à bile; (H) após 60 min. de exposição à bile; (I) após 300 min. de exposição à bile.

Embora as micropartículas recobertas com proteína do soro tenham mantido a integridade em ambos os pH, elas apresentaram comportamento diferente em relação à perda de proteína para o meio durante 120 minutos de exposição às condições gástricas. A avaliação do efeito dos tratamentos, do tempo de exposição ao SGA em pH 1,2 e 3,0, bem como a interação destes fatores sobre a solubilidade proteica é apresentada na Tabela 2. Observa-se que os tratamentos, ou seja, o tipo de microcápsula, afetou significativamente a solubilidade da proteína em pH 1,2, sendo que Microcápsulas_{PEC+PS} apresentou maior solubilização da proteína (63,40%) do que a Microcápsulas_{PEC+PS-TT}

(33,57%) durante a exposição ao SGA. Os resultados obtidos nesse experimento são contrários aos obtidos por Kitabake e Kinekawa (1998), que observaram que as proteínas do soro após tratamento térmico se tornaram susceptíveis à ação de enzimas gástricas, sendo hidrolisadas em diferentes pH, enquanto que as proteínas do soro na forma nativa não foram hidrolisadas nas mesmas condições.

Entretanto, em pH 3,0, não se observou diferença significativa na solubilidade proteica, a qual foi 5,68% e 8,84% para Microcápsulas_{PEC+PS} e Microcápsulas_{PEC+PS-TT}, respectivamente. Embora em ambas as condições de pH a solubilidade proteica tenha aumentado significativamente ao longo do tempo de exposição ao SGA (Tabela 2, Figura 13), a porcentagem de proteína solubilizada no pH mais brando, foi em média 85,02% menor do que no mais drástico pH. Tem sido reportado que a manutenção da integridade das micropartículas recobertas pelas proteínas do soro pode favorecer a manutenção da viabilidade dos micro-organismos durante a passagem pelo trato gastrointestinal (REID et al., 2005; DOHERTY et al., 2010).

Tabela 2 – Resumo da Análise de Variância (ANOVA). Efeito do tratamento, tempo e interação tratamento x tempo sobre a solubilidade proteica das microcápsulas após exposição a suco gástrico artificial (SGA) pH 1,2 e 3,0.

Fator de variação	GL	Valores de p	
		Solubilidade (SGA pH 1,2)	Solubilidade (SGA pH 3,0)
Tratamento*	1	< 0,001	0,096
Tempo**	2	0,014	0,001
Tratamento x Tempo	2	0,337	0,592

*Tratamentos: Microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro; Microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro após tratamento térmico. **Tempos: 0, 60 e 120 minutos de exposição a suco gástrico artificial.

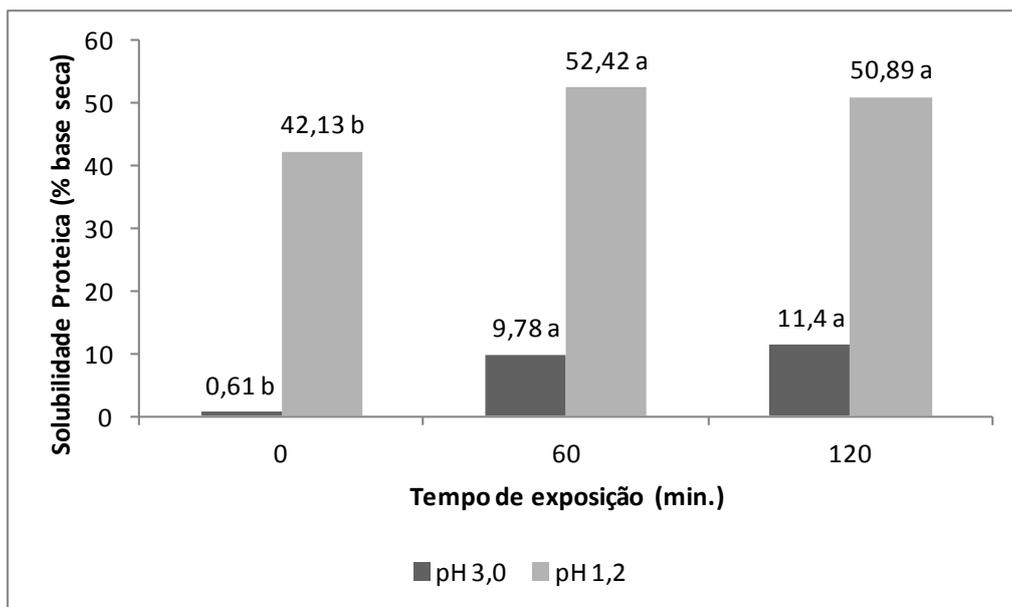


Figura 13 – Solubilidade proteica (% em base seca) das microcápsulas durante 120 minutos de exposição a suco gástrico artificial pH 1,2 ou 3,0. a, b – para cada pH (1,2 ou 3,0), letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

3.2.2. Avaliação da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* La5 nas microcápsulas expostas a condições gastrointestinais simuladas

A viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* nas formas livre e microencapsulada expostos a incubação sequencial em SGA pH 1,2 e SIA pH 7,0 é apresentada na Tabela 3. Observa-se que a microencapsulação não conferiu proteção ao micro-organismo exposto a condição drástica de pH quando comparado ao micro-organismo livre. Após 120 min. de exposição ao pH 1,2, apesar das micropartículas manterem-se íntegras (Figuras 6, 8 e 10) a viabilidade do micro-organismo ficou abaixo do limite de detecção do método (< 2 ciclos log.), mostrando que o recobrimento com a proteína do soro não foi suficiente para proteger o micro-organismo, devido provavelmente à porosidade presente em todas as micropartículas. Após a exposição ao pH 7,0 nas condições de SIA, o micro-organismo na forma livre e na microcápsula recoberta com proteína de soro (Microcápsulas_{PEC+PS}) apresentou ligeira recuperação, não atingindo entretanto contagens mínimas estabelecidas para exercerem efeito probiótico.

Tabela 3 - Viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* (log UFC/g) durante exposição sequencial a SGA (pH 1,2) por 120 min. e SIA (pH 7,0) por mais 300 min.

Incubação sequencial	Tratamentos				
	Tempo (min.)	La5 livre	¹ Microcápsulas	² Microcápsulas	³ Microcápsulas
			PEC	PEC+PS	PEC+PS-TT
	0	8,51 ± 0,23 ^a	6,88 ± 0,19 ^a	6,59 ± 0,26 ^a	6,84 ± 0,14 ^a
SGA pH 1,2	60	2,28 ± 1,97 ^b	2,19 ± 3,80 ^{ab}	2,18 ± 1,91 ^b	2,58 ± 2,33 ^b
	120	< 2 ^b	< 2 ^b	< 2 ^b	< 2 ^b
SIA pH 7,0	300	3,55 ± 0,99 ^b	< 2 ^b	2,52 ± 0,69 ^b	< 2 ^b

¹Microcápsulas_{PEC}: Microcápsulas de pectina; ²Microcápsulas_{PEC+PS}: Microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro; ³Microcápsulas_{PEC+PS-TT}: Microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro após tratamento térmico. a, b – para cada tratamento, médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente (p<0,05).

A exposição a SGA pH 3,0 e sequencialmente a SIA pH 7,0 não foi tão prejudicial ao *Lactobacillus acidophilus* (Tabela 4). Na forma livre, o micro-organismo apresentou redução de 3,54 ciclos logarítmicos após os 420 minutos de exposição. Entretanto, nas microcápsulas o micro-organismo apresentou menores reduções: 1,51; 1,59 e 1,67 ciclos logarítmicos para a Microcápsulas_{PEC}, Microcápsulas_{PEC+PS} e Microcápsulas_{PEC+PS-TT} respectivamente. Essa menor redução da viabilidade do micro-organismo em pH 3,0 provavelmente ocorreu devido a esse valor de pH ser menos prejudicial e mais próximo do pH ótimo de crescimento do *Lactobacillus acidophilus* (pH 5,5), do que o pH 1,2, que é uma condição drástica para o micro-organismo.

Esses resultados sugerem que, apesar do recobrimento das microcápsulas de pectina com proteína de soro, tratada ou não termicamente, ainda existe uma porosidade na sua superfície, que permitiu a difusão de íons H⁺ para seu interior, afetando a viabilidade do micro-organismo probiótico, e esse efeito prejudicial foi mais intenso no pH mais drástico.

Tabela 4 - Viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* (log UFC/g) durante exposição sequencial a SGA (pH 3,0) por 120 min. e SIA (pH 7,0) por mais 300 min.

Incubação sequencial	Tratamentos				
	Tempo (min.)	La5 livre	¹ Microcápsulas PEC	² Microcápsulas PEC+PS	³ Microcápsulas PEC+PS-TT
	0	8,48 ± 0,27 ^a	6,96 ± 0,12 ^a	6,81 ± 0,13 ^a	6,93 ± 0,27 ^a
SGA pH 3,0	60	8,13 ± 0,50 ^a	6,61 ± 0,17 ^a	6,50 ± 0,13 ^a	6,59 ± 0,14 ^{ab}
	120	7,77 ± 0,27 ^a	6,28 ± 0,53 ^{ab}	6,05 ± 0,53 ^a	6,17 ± 0,59 ^{ab}
SIA pH 7,0	300	4,94 ± 0,93 ^b	5,45 ± 0,34 ^b	5,22 ± 0,17 ^b	5,26 ± 0,78 ^b

¹Microcápsulas_{PEC}: Microcápsulas de pectina; ²Microcápsulas_{PEC+PS}: Microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro; ³Microcápsulas_{PEC+PS-TT}: Microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro após tratamento térmico. a, b – para cada tratamento, médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0,05).

Avaliando-se os resultados da solubilidade proteica e da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* durante a exposição a condições gastrointestinais simuladas através da análise de regressão linear, observou-se que existe uma correlação significativa (p=0,0092) entre os dois fatores (Figura 14, Anexo 2), representada pelo decréscimo da viabilidade em função do aumento da solubilidade proteica. Assim, entre as microcápsulas recobertas com proteína de soro, quanto maior a perda de proteína da partícula, menor a viabilidade do micro-organismo probiótico.

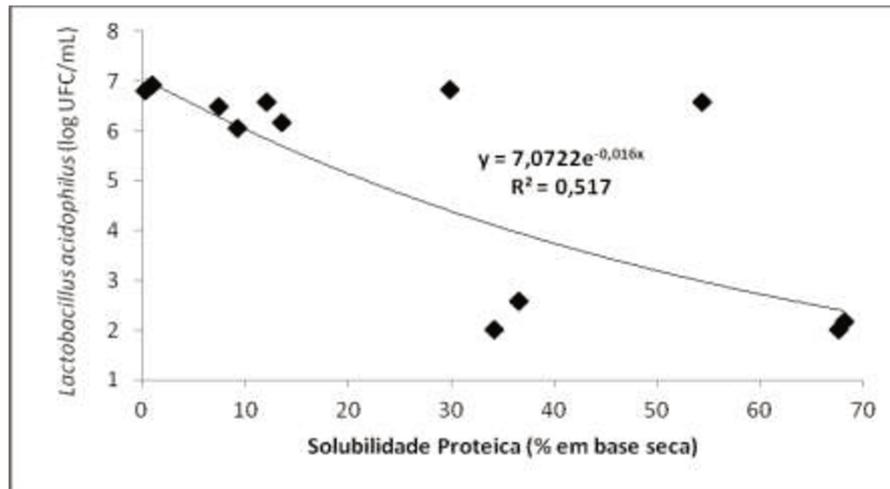


Figura 14 – Correlação entre a solubilidade proteica das microcápsulas recobertas com proteína de soro e a viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* durante a exposição a condições gastrointestinais simuladas. (Intervalo de confiança [-0,1059; -0,0192] com nível de significância de 95%)

A exposição à solução de bile 0,5% afetou a viabilidade do *Lactobacillus acidophilus*, que apresentou reduções significativas para o micro-organismo na forma livre e em microcápsulas de pectina, conforme mostrado na Tabela 5. Isso mostra que a solução de bile 0,5% possui um rápido efeito nocivo ao *L. acidophilus*. Segundo Madureira et al. (2011), os sais biliares apresentam efeito antimicrobiano, dissolvendo as membranas dos micro-organismos, o que restringe sua sobrevivência ao trato gastrointestinal.

Tabela 5 - Viabilidade do *L. acidophilus* (log UFC/g) durante exposição à solução de bile 0,5% (pH 7,0) por 300 minutos.

Tempo (min.)	Tratamentos			
	La5 livre	¹ Microcápsulas _{PEC}	² Microcápsulas _{PEC+PS}	³ Microcápsulas _{PEC+PS-TT}
0	7,42 ± 0,81 ^a	6,35 ± 0,24 ^a	6,51 ± 0,15 ^a	6,60 ± 0,23 ^a
60	0,71 ± 1,24 ^b	2,19 ± 2,02 ^b	5,17 ± 0,08 ^{ab}	5,18 ± 0,65 ^a
300	< 2 ^b	< 2 ^b	2,31 ± 2,16 ^b	< 2 ^b

¹Microcápsulas_{PEC}: Microcápsulas de pectina; ²Microcápsulas_{PEC+PS}: Microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro; ³Microcápsulas_{PEC+PS-TT}: Microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro após tratamento térmico. a, b – para cada tratamento, médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0,05).

O efeito nocivo da bile sobre o *L. acidophilus* foi maior para o micro-organismo livre e nas microcápsulas de pectina do que nas microcápsulas recobertas com proteína do soro, durante os primeiros 60 minutos de exposição. Segundo Doherty et al. (2011), isso pode ter ocorrido pelo fato de que as microcápsulas produzidas por gelificação iônica possuem poros largos em sua superfície o que pode permitir a exposição dos micro-organismos aos grupos ácidos e enzimas, diminuindo sua viabilidade (DOHERTY et al., 2011). Entretanto, é importante observar que no pH 7,0, utilizado na solução de bile, as microcápsulas recobertas com proteína do soro foram completamente desfeitas, imediatamente após a exposição, conforme mostrado por microscopia óptica (Figura 12) o que significa que durante todo o período de exposição à bile (300 minutos), o micro-organismo não esteve efetivamente dentro das microcápsulas de pectina recobertas com proteína do soro. Provavelmente a menor redução na viabilidade durante os primeiros 60 minutos, ocorreu devido à presença das proteínas do soro do leite que, junto ao micro-organismo podem exercer algum efeito protetivo, pelo menos por determinado tempo, como observado por Reid et al. (2005), Doherty et al. (2010) e Madureira et al. (2011), que verificaram maior proteção aos micro-organismos probióticos na presença de proteínas do soro, após simulação do trato gastrointestinal.

4. CONCLUSÕES

A microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* por gelificação iônica, utilizando pectina como material de parede, com ou sem recobrimento com proteína do soro tratada ou não termicamente foi realizada com sucesso, sem perdas da viabilidade do probiótico durante o processo.

Durante a exposição às condições gastrointestinais simuladas as microcápsulas de pectina mantiveram-se íntegras, enquanto que as microcápsulas recobertas com proteína de soro, tratada ou não termicamente se romperam após exposição à simulação das condições intestinais, possibilitando a liberação do micro-organismo probiótico no intestino.

A microencapsulação do *Lactobacillus acidophilus* La5 não foi eficiente na proteção do micro-organismo durante a simulação das condições gastrointestinais em pH drástico (pH 1,2) ou solução de bile 0,5%. Entretanto, o *Lactobacillus acidophilus* La5 microencapsulado apresentou menor perda de viabilidade (~2 ciclos logarítmicos) quando exposto às condições que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal (pH 3,0) quando comparado ao micro-organismo livre, sugerindo a vantagem da microencapsulação para veiculação deste micro-organismos.

Os resultados evidenciam que tanto para as condições estudadas quanto para o *Lactobacillus acidophilus* La5, o recobrimento da microcápsula de pectina com proteína do soro não confere maior efeito protetivo ao probiótico.

5. REFERÊNCIAS

- AOAC. Association of Official Methods Analytical Chemists. **Official Methods of Analytical Chemists of the Association Chemistry**, 2006.
- BRITTEN, M.; GIROUX, H. J. Acid-induced gelation of whey protein polymers: effects of pH and calcium concentration during polymerization. **Food Hydrocolloids**, v. 15, n. 4-6, p. 609-617, 2001.
- BUDDINGTON, R. Using probiotics and prebiotics to manage the gastrointestinal tract ecosystem. In: CHARALAMPOPOULOS, D.; RASTALL, R. A. **Prebiotics and Probiotics Science and Technology**. Springer Science+Business Media, 2009, 1248 p.
- CONSIDINE T.; PATEL, H. A.; ANEMA, S. G.; SINGH, H.; CREAMER, L. K. Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments — A Review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 1–23, 2007.
- DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 130-135, 1960.
- DOHERTY, S. B.; GEE, V. L.; ROSS, R. P.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; BRODKORB, A. Efficacy of whey protein gel networks as potential viability-enhancing scaffolds for cell immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, p. 231-241, 2010.
- DOHERTY, S. B.; GEE, V. L.; ROSS, R. P.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; BRODKORB, A. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1604-1617, 2011.
- FLORIS, R.; BODNÁR, I.; WEINBRECK, F.; ALTING, A. C. Dynamic rearrangement of disulfide bridges influences solubility of whey protein coatings. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 566-573, 2008.
- GBASSI, G. K.; VANDAMME, T.; ENNAHAR, S.; MARCHIONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 1, p. 103-105, 2009.
- GBASSI, G. K.; VANDAMME, T.; YOULOU, F. S.; MARCHIONI, E. In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 97-102, 2011.

GEREZ, C. L.; FONT DE VALDEZ, G. GIGANTE, M. L.; GROSSO, C. R. F. Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhammnous* CRL 1505 to low pH. **Letter in Applied Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 552–556, 2012.

GROSSO, C. R. F.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yoghurt. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 151-156, 2004.

HAMMES, W. P.; HERTEL, C. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria**. - Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacter. 3^a edSpringer Science Business Media, LLC, 2006, 1140 p.

HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, p. 291-311, 2012.

KAILASAPATHY, K. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 39-48, 2002.

KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. **LWT** v. 39, p. 1221-1227, 2006.

KITABATAKE, N.; KINEKAWA, Y. I. Digestibility of bovine milk whey protein and β -Lactoglobulin in vitro and in vivo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 4917-4923, 1998.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Review: Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 3-13, 2003.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 737-743, 2004.

LAHTINEN S.J.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. J.; FORSELL, P.; MYLLARINEN, P. Effect of starch- and lipid-based encapsulation on the culturability of two *Bifidobacterium longum* strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 500–505, 2007.

LISERRE, A. M.; RÉ, M. I.; FRANCO, B. D. G. M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and

- evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, v. 21, p. 1-16, 2007.
- LIU, L.; FISHMAN, M. L.; KOST, J.; HICKS, K. B. Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. **Biomaterials**, v. 24, n. 19, p. 3333- 3343, 2003.
- MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, p. 465-470, 2011.
- MOZZI, F.; GERBINO, E.; FONT DE VALDEZ, G.; TORINO, M. I. Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in an *in vitro* gastric system. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 56-64, 2009.
- MUKAI-CORREA, R.; PRATA, S.; ALVIM, I. D.; GROSSO, C. R. F. Controlled release of protein from hydrocolloid gel microbeads before and after drying. **Current Drug Delivery**, v. 1, n. 3, p. 265-273, 2004.
- PICOT, A.; LACROIX, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 505-515, 2004.
- RAO, A. V.; SHIWNARAIN, N.; MAHARAJ, I. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. **Canadian Institute of Food Science and Technology**, v. 22, n. 4, p. 345-349, 1989.
- RAY, B. **Fundamental food microbiology**. 3^a ed. CRC Press LLC, 2004, 608 p.
- REID, A. A.; VUILLEMARD, J. C.; BRITTEN, M.; ARCAND, Y.; FARNWORTH, E.; CHAMPAGNE, C. P. Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca²⁺-induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, n. 6, p. 603–619, 2005.
- RIBEIRO, M. C. E. **Produção e caracterização de iogurte probiótico batido adicionado de *Lactobacillus acidophilus* livre e encapsulado**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA/UNICAMP, 2011, 75p.
- ROACH, P.; FARRAR, D.; PERRY, C. C. Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 22, p. 8168-8173, 2005.
- SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 8, p. 689-753, 1998.

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

SOULIMAN, S.; BLANQUET, S.; BEYSSAC, E.; CARDOT, J. M. A level A in vitro/in vivo correlation in fasted and fed states using different methods: Applied to solid immediate release oral dosage form. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 7, p. 72-79, 2006.

XIE, H. G.; ZHENG, J. N.; LI, X. X.; LIU, X. D.; ZHU, J.; WANG, F.; XIE, W. Y.; MA, X. J. Effect of Surface Morphology and Charge on the Amount and Conformation of Fibrinogen Adsorbed onto Alginate/Chitosan Microcapsules. **Langmuir**, v. 26, n. 8, p. 5587-5594, 2009.

CAPÍTULO 4

PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE QUEIJO PRATO ADICIONADO DE *Lactobacillus acidophilus* La5 LIVRE E MICROENCAPSULADO

CAPÍTULO 4 – PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE QUEIJO PRATO ADICIONADO DE *Lactobacillus acidophilus* La5 LIVRE E MICROENCAPSULADO

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de queijo Prato adicionado de *Lactobacillus acidophilus* La5 livre ou em microcápsulas de pectina recobertas ou não com proteína de soro, durante 60 dias de armazenamento refrigerado. As microcápsulas foram produzidas através da associação das técnicas de gelificação iônica e coacervação complexa e foram caracterizadas quanto a morfologia, tamanho médio, teor de umidade, proteínas e lipídeos e quanto à viabilidade do *Lactobacillus acidophilus*. Os queijos adicionados de *Lactobacillus acidophilus* La5 foram avaliados quanto ao pH, acidez, proteólise, perfil eletroforético e de textura e viabilidade das culturas probiótica e tradicional após 1, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento refrigerado. Após 30 dias de armazenamento sob refrigeração os queijos foram expostos a condições que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal e foi avaliada a viabilidade do *L. acidophilus*. Também foram avaliadas a microestrutura dos queijos, por microscopia eletrônica de varredura, e a aceitação sensorial dos produtos, através de teste de preferência do consumidor. O processo de microencapsulação mostrou-se eficiente, já que não houve perdas na viabilidade do *L. acidophilus* durante o processo. As microcápsulas apresentaram morfologia característica e não apresentaram diferença significativa em relação aos teores de umidade, lipídeos e em relação ao tamanho médio. Os queijos adicionados de *Lactobacillus acidophilus* La5 apresentaram composição típica de queijo Prato tradicional, não havendo diferença entre os tratamentos. Entretanto, a contagem do micro-organismo probiótico na porção de queijo ficou cerca de 1 log abaixo do estabelecido pela legislação brasileira para produtos probióticos. Durante o armazenamento refrigerado, os tratamentos não afetaram significativamente o pH, a acidez, a % do nitrogênio solúvel em pH 4,6 (%NT), a % do nitrogênio solúvel em TCA 12% (%NT) e a textura dos queijos, que foram afetados somente pelo tempo (exceto o pH). A degradação proteica dos queijos apresentou comportamento típico para queijo Prato, com aumento do NS-pH 4,6 (%NT) e do NS-TCA 12% (%NT), e redução da

firmeza dos queijos. Os queijos apresentaram redução de cerca de 1 ciclo log na população de *L. acidophilus* durante 60 dias de armazenamento refrigerado, entretanto, a microencapsulação não conferiu maior proteção ao *L. acidophilus* La5. Durante a simulação da passagem pelo trato gastrointestinal não houve redução significativa do *L. acidophilus*. A aceitação sensorial dos queijos foi boa, com boa intenção de compra. Os resultados indicam que o queijo Prato é um veículo adequado para a inclusão de microorganismos probióticos.

1. INTRODUÇÃO

As cepas probióticas utilizadas para consumo humano devem ter seus efeitos benéficos à saúde comprovados, e serem reconhecidas como seguras (“GRAS” - *General Recognised As Safe*) (FAO/WHO, 2001). As cepas mais utilizadas são de *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. (VASILJEVIC e SHAH, 2008). A adição do micro-organismo probiótico ao alimento deve levar em consideração diversos parâmetros, entre eles, o tipo de cultura e a concentração adicionada, a sobrevivência às condições de processamento e ao armazenamento do produto e os efeitos sobre as propriedades sensoriais do produto ao qual foi adicionado (REID et al., 2007; FRANZ et al., 2011).

Os alimentos probióticos são, em geral, leites fermentados, ou outros produtos com vida de prateleira curta, entretanto, os queijos, inclusive os maturados, podem ser adicionados de micro-organismos probióticos, mas devem ser avaliados quanto à manutenção da viabilidade desses micro-organismos até o final da maturação (ROSS et al., 2002). A adição de micro-organismos probióticos em queijos pode afetar a proteólise, uma vez que esses micro-organismos são produtores de enzimas proteolíticas, sendo responsáveis pela produção de compostos de aroma e sabor nos queijos maturados, o que pode afetar a aceitação sensorial dos produtos.

O *Lactobacillus acidophilus* é um dos micro-organismos probióticos mais utilizados em produtos lácteos e em pesquisas e sua adição em queijo Prato, que é um dos queijos mais consumidos no Brasil, pode resultar em um produto de alto valor agregado. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de queijo Prato probiótico, adicionado de *Lactobacillus acidophilus* livre ou em microcápsulas de pectina recobertas ou não com proteína de soro, durante 60 dias de armazenamento refrigerado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparo das culturas

Cultura estoque de *Lactobacillus acidophilus* La5 (Christian Hanen, Valinhos, Brasil) congelada foi reativada em caldo MRS (2% v/v) por duas vezes consecutivas, através da incubação a 37°C por 15 horas. A cultura reativada foi centrifugada a 7.974 g por 10 minutos a 4°C (Centrífuga Sorvall Instruments RC5C – DUPONT), em tubos de polipropileno esterilizados. O concentrado de células obtido após a centrifugação foi resuspenso em água peptonada (0,1% v/v) e centrifugado novamente nas mesmas condições, seguido de resuspensão em água peptonada para obtenção de um concentrado de células com 10^9 - 10^{10} UFC/mL. Um concentrado celular foi preparado para cada experimento e a viabilidade foi avaliada por plaqueamento em profundidade em ágar MRS, com incubação a 37°C por 72 horas em jarras de anaerobiose usando gerador de anaerobiose GasPak (DE MAN et al., 1960). O concentrado celular de *Lactobacillus acidophilus* foi utilizado para a produção das microcápsulas e para a fabricação dos queijos probióticos.

Cultura liofilizada tipo O, constituída de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (R 704 - Chr. Hansen, Valinhos, Brasil) foi inoculada em leite desnatado reconstituído estéril e incubada a 30°C /16 h e utilizada para fabricação dos queijos.

2.2. Produção das microcápsulas contendo *Lactobacillus acidophilus*

A microencapsulação do *Lactobacillus acidophilus* foi realizada através da combinação de técnicas de gelificação iônica e coacervação complexa, conforme descrito por Ribeiro (2011) e Gerez et al. (2012). Inicialmente, uma emulsão contendo solução de pectina cítrica de baixo grau de esterificação amidada (2 % p/p) e manteiga sem sal (2 % p/p) em pH 4,0 foi preparada a partir de agitação a 14.000 rpm/5min (Ultraturrax - IKA, Works do Brasil). À emulsão adicionou-se o concentrado de células de *L. acidophilus* contendo aproximadamente 10^{10} UFC/mL, agitando-se novamente em ultraturrax (6000rpm/1min) para incorporação das células à emulsão. A emulsão obtida

foi aspergida através de um bico atomizador duplo fluido (diâmetro de 1 mm) em uma solução de cloreto de cálcio (2 % p/v) em pH 4,0, havendo a formação das microcápsulas, que foram mantidas sob agitação constante (410 rpm) por 30 minutos na solução de CaCl₂ para completa gelificação. Após esse período, as microcápsulas foram removidas, drenadas em peneira (poro de 0,125 mm) e lavadas com água deionizada com pH 4,0, obtendo-se assim as microcápsulas de pectina por gelificação iônica (Microcápsulas_{PEC}). As Microcápsulas_{PEC} foram colocadas em solução de concentrado proteico de soro (CPS) (4% p/v) em pH 4,0 previamente tratada termicamente a 80°C/15 minutos, em banho térmico sob agitação. As microcápsulas foram mantidas nessa solução por 30 minutos, sob agitação (410 rpm), para propiciar o recobrimento das partículas de pectina com as proteínas do soro. Decorrido este tempo, as micropartículas foram removidas da solução e novamente lavadas com água deionizada pH 4,0, obtendo-se assim as microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro após tratamento térmico (Microcápsulas_{PEC+PS-TT}).

2.2.1. Composição físico-química das microcápsulas

A caracterização físico-química das microcápsulas recém produzidas foi feita através da avaliação do tamanho médio e da distribuição de tamanho das partículas, morfologia e dos teores de proteína, umidade e lipídeos.

A avaliação do diâmetro médio e sua distribuição de tamanho foram realizadas utilizando o analisador de tamanho de partículas Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, United Kingdom). A morfologia foi observada em microscópio óptico (Jenaval) utilizando objetiva de 25x e optovar de 1,25x com captação de imagens por câmera digital, com a utilização do software EDN-2 – Microscopy Image Processing System. Também foi realizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para observação da microestrutura das microcápsulas e para isso as mesmas foram liofilizadas. Para a obtenção das microcápsulas liofilizadas, as microcápsulas recém produzidas foram congeladas em freezer a -80°C e, em seguida, submetidas ao processo de liofilização (liofilizador Edwards Pirani 501) por aproximadamente 48 horas, nas seguintes condições operacionais: temperatura do condensador -60 °C, pressão 10⁻¹ mbar e temperatura final de 25°C. As microcápsulas

liofilizadas foram fixadas em stubs de alumínio (1cm x 1cm) e recobertas com fina camada de ouro (180 segundos e corrente de 40 mA) por meio de um Sputter Coater. Foi utilizado microscópio eletrônico de varredura modelo JSM – 5800LV Jeol, com aceleração de voltagem de 20 kV.

Os teores de umidade e proteína das micropartículas foram determinados segundo metodologias descritas pela AOAC (2006), e o teor de lipídeos segundo Bligh e Dyer (1959). A umidade foi determinada através de secagem em estufa a 105°C por 15 horas. O teor de nitrogênio total das partículas e da pectina utilizada na sua produção foi determinado por Kjeldahl. Para o cálculo do nitrogênio referente à adsorção da proteína do soro na micropartícula, o teor de nitrogênio presente na pectina foi descontado do teor de nitrogênio total das partículas. O teor de proteína adsorvida na partícula foi calculado multiplicando-se o nitrogênio referente à adsorção da proteína do soro por 6,38. Os resultados da porcentagem de proteína adsorvida nas micropartículas foram expressos em base seca.

Para a correta determinação do teor de lipídeos, foi necessário realizar a digestão prévia da proteína das microcápsulas, para a extração completa do conteúdo lipídico. Para isto, foram pesados 5g de microcápsulas em tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 10 mL de solução de citrato de sódio (2% p/v), para dissolução das mesmas. Em seguida, adicionou-se 0,3mg/g de pepsina e o pH da solução foi ajustado para 3,0, seguindo-se agitação por 1 minuto. Os tubos foram mantidos a 37°C em banho metabólico com agitação por 4 horas. Após esse período, adicionou-se 0,3mg/g de pancreatina e o pH da solução foi ajustado para 7,0, seguindo-se novamente agitação por 1 minuto. Os tubos foram mantidos a 37°C por mais 12 horas, e após esse tempo seguiu-se a metodologia normal de extração pelo método de Bligh e Dyer (1959).

2.2.2. Avaliação da viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La5 nas microcápsulas recém produzidas

A viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* nas microcápsulas foi determinada por meio da contagem de células viáveis. Para o rompimento das microcápsulas e liberação dos micro-organismos, as mesmas foram colocadas em solução de citrato de sódio (2 % p/v) em pH 7,0 e submetidas a vigorosa agitação por 5 minutos (GROSSO e

FÁVARO-TRINDADE, 2004; KRASAEKOOPT et al., 2004). Em seguida, foram realizadas diluições sucessivas em água peptonada (0,1 % p/v), e plaqueamento em profundidade em placas de Petri utilizando ágar MRS. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas em jarra anaeróbia, utilizando-se gerador de anaerobiose, com posterior contagem da população de micro-organismos probióticos (DE MAN et al., 1960).

2.3. Fabricação do queijo Prato

Os queijos foram fabricados pelo método tradicional, conforme descrito por Furtado e Lourenço Neto (1994), em tanque automático, dotado de lira e controle de agitação, conforme mostrado na Figura 1.

Para a fabricação do queijo Prato, utilizaram-se 200 L de leite (Laticínio Atilatte – Fazenda Atibainha, Atibaia, SP) pasteurizado (63°C/30 minutos) e resfriado a 35°C. Adicionou-se cultura láctica tipo O (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* - R704, Chr. Hansen) na proporção de 1% (v/v) sobre o volume de leite, cloreto de cálcio (250 ppm), corante urucum (80 ppm) e coagulante (Ha La 1175, Chr. Hansen) em quantidade suficiente para coagulação em 35 minutos. Após 35 minutos, o coágulo foi cortado em cubos de 1 cm de aresta, com agitação lenta progressiva durante 15 minutos, seguido de repouso por 5 minutos. Realizou-se a dessoragem parcial, através da remoção de 30% do volume do soro, seguido de adição de água a 80°C, para a etapa de cozimento da massa até 42°C, com aumento gradativo de 1°C a cada 3 minutos até atingir o ponto de massa. Após a etapa de cozimento, o soro foi parcialmente drenado e a massa foi dividida em três lotes iguais, sendo pesada e coberta com soro a 42°C. Cada lote foi submetido a um dos seguintes tratamentos: **1)** adicionado de *L. acidophilus* livre (0,5% v/p); **2)** adicionado de microcápsulas de pectina (10% p/p); **3)** adicionado de microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro (10% p/p). Em seguida, o soro de cada lote foi drenado totalmente e a massa enformada, em formas retangulares de 0,5 kg, e prensada (30psi por 30 min. e 50psi por 90 min.) em prensa pneumática. Após a prensagem, os queijos permaneceram por 5 horas em temperatura ambiente para fermentação, seguida de salga em salmoura (20%)

por 10 horas (5°C). Ao final da salga, os queijos foram secos por 48 horas (12°C), embalados a vácuo e armazenados a 12°C para avaliação periódica.

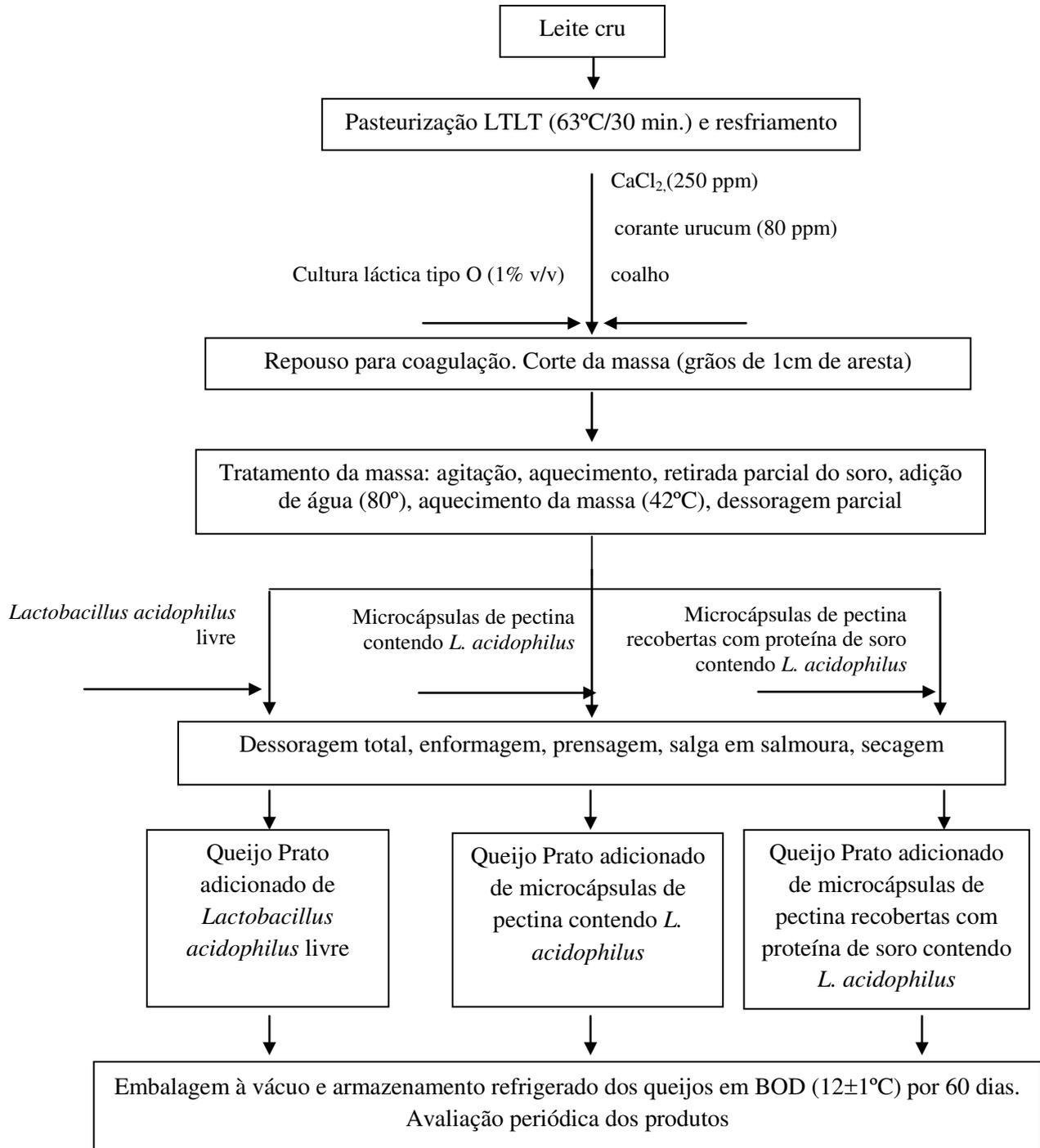


Figura 1 - Fluxograma de produção dos queijos

2.3.1. Caracterização físico-química e microbiológica do leite

A caracterização físico-química do leite cru foi realizada através da análise de pH, acidez através da titulação com hidróxido de sódio N/9 em presença de indicador fenolftaleína, densidade através de lactodensímetro com correção de temperatura e gordura pelo método de Gerber, segundo AOAC (2006), e extrato seco total pelo disco de Ackermann. O leite pasteurizado foi avaliado quanto ao teor de gordura pelo método de Gerber, pH, acidez através da titulação com hidróxido de sódio N/9 em presença de indicador fenolftaleína, extrato seco total por secagem em estufa a 105°C e cinzas por incineração em mufla a 550°C, conforme descrito na AOAC (2006). Foi utilizado o método de Kjeldahl (AOAC, 2006) para a determinação dos teores de Nitrogênio Total (NT), Nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS pH 4,6) e Nitrogênio solúvel TCA 24% (NS TCA 24%). A partir desses valores foram calculados os teores de proteína total (através da diferença entre o NT e o NS TCA 24%, multiplicado por 6,38) e caseína (através da diferença entre o NT e o NS pH 4,6, multiplicado por 6,38.) A eficiência da pasteurização foi avaliada através da atividade das enzimas lactoperoxidase e fosfatase alcalina segundo LANARA (1981) e AOAC (2006).

Para caracterização microbiológica, o leite cru e o leite pasteurizado foram avaliados quanto à contagem padrão em placas e contagem de micro-organismos psicrotróficos, segundo metodologia da APHA (2004). Para as análises, uma alíquota de 10 mL do leite foi transferida para um frasco contendo 90 mL de solução de água peptonada 0,1% (p/v), obtendo-se assim a diluição 10^{-1} . A partir desta, foram feitas as diluições subsequentes necessárias à realização das análises. A contagem padrão em placas foi realizada pelo método de plaqueamento em profundidade, utilizando ágar padrão (PCA), incubando as placas a 35°C/48 horas. Para a contagem de psicrotróficos utilizou-se ágar padrão (PCA), com plaqueamento em superfície e incubação a 7°C/10 dias.

2.4. Caracterização físico-química e microbiológica dos queijos

No dia seguinte à embalagem dos queijos (dia 1), amostras de cada tratamento foram aleatoriamente escolhidas para avaliação da composição físico-química. A partir desse ponto, periodicamente (15, 30, 45 e 60 dias após a embalagem) amostras de queijo foram avaliadas quanto ao pH, acidez, umidade, proteólise, perfil eletroforético, perfil de textura e viabilidade do micro-organismo probiótico e da cultura láctica tradicional. O padrão microbiológico dos queijos probióticos foi avaliado logo após a fabricação, através de contagens de coliformes a 45°C, de estafilococos coagulase positiva, pesquisa de *Salmonella* sp. e de *Listeria monocytogenes*. A característica sensorial e a microestrutura do queijo Prato foram avaliadas após 30 dias de armazenamento refrigerado. Os queijos também foram expostos a condições que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal para avaliação da viabilidade do micro-organismo probiótico, após 30 dias de armazenamento refrigerado.

2.4.1. Análises físico-químicas dos queijos Prato adicionados de *Lactobacillus acidophilus*

Para a execução das análises, foi realizada amostragem dos queijos segundo APHA (2004). A parte externa dos queijos foi retirada, desprezando aproximadamente 0,5 cm de todos os lados. As amostras foram então trituradas até a obtenção de partículas de 2 a 3 mm, que foram utilizadas para as análises, conforme descrito a seguir.

- pH: Foi utilizado potenciômetro devidamente calibrado, com o eletrodo introduzido diretamente nas amostras de queijo.
- Acidez titulável: Determinada através da titulação com hidróxido de sódio 0,1N em presença de indicador fenolftaleína, de acordo com AOAC (2006).
- Extrato seco total (EST): Determinação por secagem em estufa a 105°C de acordo com AOAC (2006).
- Gordura: Determinada pelo método de Gerber de acordo com British Standard Institution (1989);
- Cinzas: Determinada por incineração em mufla a 550°C, de acordo com AOAC (2006).

- Sal: Foi determinado pelo método Volhard (RICHARDSON,1985).
- Nitrogênio total (NT): Foi determinado através do método macro-Kjeldahl, de acordo com AOAC (2006) utilizado o fator de conversão 6,38.
- Nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS-pH 4,6): Foi determinado através do nitrogênio solúvel do filtrado após a precipitação no ponto isoelétrico da caseína (pH 4,6) pelo método macro-Kjeldahl, de acordo com AOAC (2006).
- Nitrogênio solúvel em TCA 12% (NS-TCA 12%): Foi determinado através do nitrogênio solúvel do filtrado, após precipitação pela adição de ácido tricloroacético (TCA 12%), pelo método macro-Kjeldahl, de acordo com AOAC (2006).
- Proteína: Calculada da diferença entre nitrogênio total e o nitrogênio solúvel em TCA 12%, multiplicado por 6,38.
- Caseína: Calculada pela diferença entre nitrogênio total e o nitrogênio solúvel em pH 4,6, multiplicado por 6,38.

A proteólise foi avaliada com base nos valores de Nitrogênio solúvel em pH 4,6 em relação ao Nitrogênio Total – NS pH4,6(%NT), e de Nitrogênio solúvel em TCA 12% em relação ao Nitrogênio Total – NS TCA12%(%NT). Esses valores foram utilizados para comparar a proteólise dos queijos frente aos diferentes tratamentos.

Perfil eletroforético

As amostras de queijo foram digeridas em solução tampão com adição de β -mercaptanol e em seguida congeladas em tubos Eppendorf até o momento da análise. As amostras foram analisadas em gel polimerizado de Uréia de acordo com o método de Andrews (1983) com modificações, com 4% e 9% de poliacrilamida no gel de cobertura e de corrida respectivamente. A separação das bandas ocorreu na voltagem constante de 90V por 15 minutos e depois à 120V até a linha da banda chegar ao final do gel. As bandas foram reveladas por imersão do gel em *Brilliant Blue Coloidal*.

Perfil de textura dos queijos

Para a avaliação da textura, cilindros de 2 cm de diâmetro e 2,4 cm de altura foram retirados do queijo com o auxílio de uma sonda de alumínio, acondicionados em sacos impermeáveis e mantidos em banho de água a 10°C por no mínimo 4 horas para

estabilização da temperatura. A determinação do perfil de textura foi realizada em texturômetro TA-XT2, com probe de alumínio de 35 mm de diâmetro. A velocidade do teste foi de 100 mm./min e com compressão de 40% da altura inicial do cilindro de queijo, com repetição em 5 segundos. O teste foi feito em tentuplicada (FOX *et al.*, 2000; SZCZESNIAK, 2002).

Avaliação da microestrutura dos queijos

Para a realização da microestrutura dos queijos com 30 dias de armazenamento refrigerado, as amostras foram preparadas segundo metodologia adaptada de Tamime et al. (1990) e Barros (2005).

As amostras de queijo foram cortadas em pedaços de 2,5 x 2,5 x 5,0 mm, com lâminas de aço inox e fixadas com glutaraldeído 2% em tampão fosfato de sódio 0,1M a pH 7,13 por uma noite, a temperatura ambiente. As amostras foram lavadas duas vezes com tampão fosfato 0,1M (15 min. cada lavagem), fraturadas a temperatura ambiente, retornadas para solução tampão, e então pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1M por 8 horas. Após esse tempo, as amostras foram lavadas novamente com tampão fosfato 0,1M por duas vezes (15 min.) e desidratadas gradualmente usando etanol nas concentrações de 70% (2 lavagens de 15 min.), 90% (2 lavagens de 15 min.), 95% (2 lavagens de 10 min.), 100% (3 lavagens de 10 min.) e acetona 100% (2 lavagens de 30 min). Em seguida, as amostras foram secas em secador de ponto crítico CPD 030 da Balzers, montadas em *stubbs* de alumínio com cola de prata e metalizadas com ouro usando metalizador SCD 050 também da Balzers e levadas para observação ao microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5800LV a 20 kV.

Avaliação sensorial

Antes da realização da avaliação sensorial dos queijos, foram realizadas análises para verificar se os produtos estavam dentro do padrão microbiológico estabelecido pela legislação (BRASIL, 2001), que estabelece padrões para contagem de coliformes a 45°C, estafilococos coagulase positiva e pesquisa de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*.

A avaliação sensorial dos queijos foi realizada através de teste de aceitação do consumidor (VILLANUEVA e DA SILVA, 2009), baseada na aparência, textura, sabor, aroma e impressão global do produto, utilizando-se escala hedônica estruturada de 9 pontos. A intenção de compra também foi avaliada através de escala hedônica de 5 pontos. Os testes foram realizados por uma equipe de 100 provadores não treinados, consumidores habituais do produto, recrutados aleatoriamente. As amostras foram apresentadas individualmente, em recipientes plásticos adequados, devidamente codificados com números aleatórios de 3 dígitos a uma temperatura na faixa de 7 a 10°C e avaliadas em cabines individuais, sob luz branca.

2.4.2. Análises microbiológicas dos queijos Prato adicionado de *Lactobacillus acidophilus*

Para a realização das análises, as amostras foram preparadas em condições assépticas, segundo APHA (2004). A parte externa dos queijos foi retirada, desprezando-se aproximadamente 0,5 cm de todos os lados. As amostras foram então trituradas até a obtenção de partículas de 2 a 3 mm, que foram utilizadas para as análises.

A viabilidade dos micro-organismos presentes no queijo Prato adicionado de *Lactobacillus acidophilus* foi avaliada utilizando-se metodologias seletivas, conforme descrito anteriormente. Para tais análises, pesaram-se 25 g de queijo triturado em saco plástico para homogeneização das amostras (Seward) e adicionaram-se 225 mL de solução de citrato de sódio (2%) pH 7,0. A mistura foi homogeneizada por 15 minutos em velocidade média em *Stomacher* 400 (Seward) e imediatamente utilizada para a avaliação da viabilidade dos micro-organismos. Posteriormente, foram realizadas diluições sucessivas em água peptonada 0,1% (p/v) e plaqueamento em profundidade em placas de Petri. Utilizou-se solução de citrato de sódio como primeira diluição para promover o rompimento das microcápsulas e liberação dos micro-organismos.

A contagem de *L. acidophilus* foi determinada através de plaqueamento em profundidade em ágar MRSS, preparado a partir de ágar MRS sem glicose e com adição de sorbitol (10 g/L). As placas foram incubadas a 45°C por 72 horas em anaerobiose, com posterior contagem da população de micro-organismos (OBERG et al., 2011). A

contagem dos micro-organismos da cultura de *Lactococcus lactis* foi determinada através de plaqueamento em profundidade em ágar M17, com adição de 5% de solução de lactose (10% p/v). As placas foram incubadas a 30°C por 72 horas em aerobiose, com posterior contagem dos micro-organismos (TERZAGHI e SANDINE, 1975). Para efeito de comparação entre os resultados, em cada ponto de análise dos queijos probióticos, também foram analisadas as culturas utilizadas na fabricação, a partir de um novo inóculo, seja a cultura pura de *Lactobacillus acidophilus* La5 ou a cultura de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, utilizando-se as mesmas metodologias aplicadas aos queijos.

O padrão microbiológico dos queijos Prato adicionados de *Lactobacillus acidophilus* foi avaliado logo após sua produção, por metodologias oficiais. Foram realizadas as seguintes análises, no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL):

- Contagem de coliformes a 30-35°C e a 45°C através de contagem pelo método do número mais provável (NMP), segundo ISO 4831 (2006) e ISO 7251 (2005);
- Contagem de Estafilococos coagulase positiva, segundo APHA (2004);
- Pesquisa de *Listeria monocytogenes*, segundo ISO 11290-1 (1996)
- Pesquisa de *Salmonella* spp., segundo ISO 6785 / IDF 93(2001)

2.5. Avaliação da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* nos queijos durante exposição a condições que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal

2.5.1. Preparo do suco gástrico e intestinal artificial e da solução de bile

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

HCl 1N. O suco intestinal artificial (SIA) foi preparado através da adição de solução de pancreatina ao SGA para obtenção da concentração final de 1,95g/L e em seguida, o pH foi ajustado para 7,0 com adição de NaHCO₃ 1N. A solução de bile foi preparada em água na concentração de 0,5%, foi esterilizada (121°C/15 min) e seu pH ajustado para 7,0.

2.5.2. Avaliação da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus*

A avaliação da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* durante simulação das condições gastrointestinais foi realizada com metodologia adaptada de Wang et al. (2009) e Buriti et al. (2010). A avaliação foi realizada nos queijos após 30 dias de armazenamento sob refrigeração. Inicialmente, 10 g de queijo triturado foram adicionados em erlenmeyers contendo 100 mL de suco gástrico artificial (SGA) pH 3,0 que foram incubados a 37°C sob agitação em banho metabólico tipo Dubnoff, conforme esquema apresentado na Figura 2. Imediatamente após a adição das amostras ao SGA (0 min), e após 60 e 120 minutos de exposição ao SGA, uma alíquota de 10 g (amostras de queijo em SGA) foi retirada para análise. Após a retirada da alíquota aos 120 minutos de exposição ao SGA, foi adicionada aos erlenmeyers a solução de pancreatina e o pH foi ajustado para 7,0. Os erlenmeyers foram mantidos no banho por mais 300 minutos, e, em seguida nova alíquota foi retirada para análise da viabilidade do *L. acidophilus*.

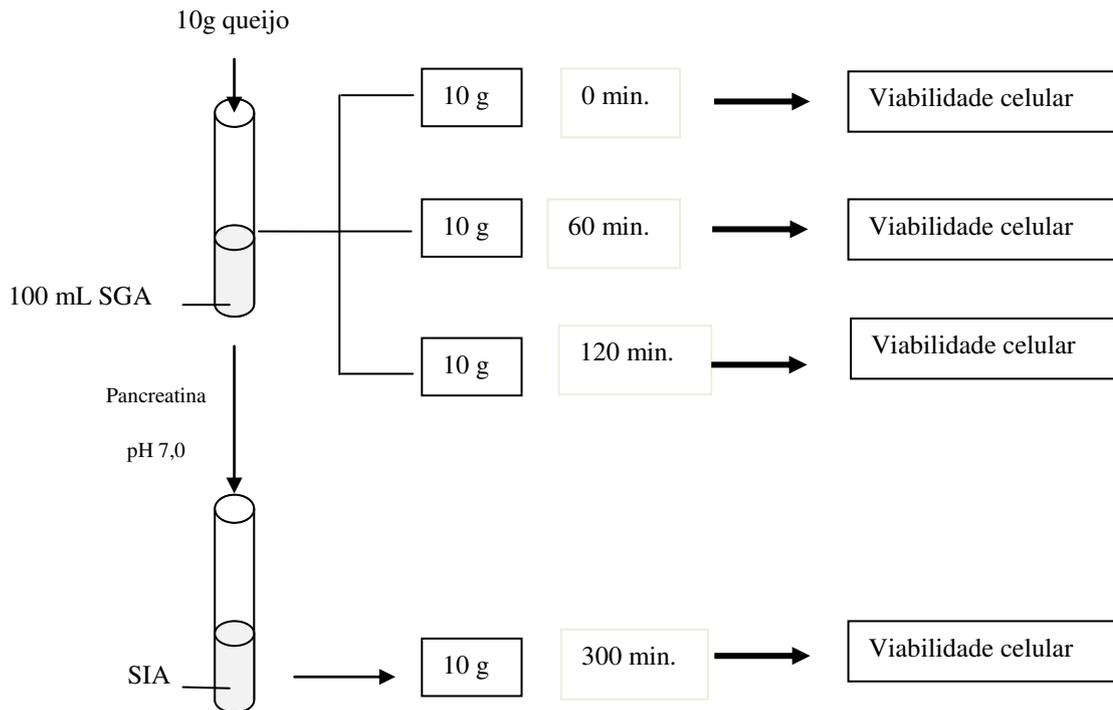


Figura 2 – Representação esquemática da avaliação da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* durante a exposição dos queijos às condições gastrointestinais simuladas. SGA: suco gástrico artificial pH 3,0; SIA: suco intestinal artificial pH 7,0.

A avaliação da resistência à bile foi realizada com 10 g de queijo, que foram adicionados a erlenmeyers contendo 100 mL de solução de bile 0,5%, com pH ajustado para 7,0 (Figura 3). Após 0, 60 e 300 minutos de exposição à bile, alíquotas foram retiradas para análise da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus*.

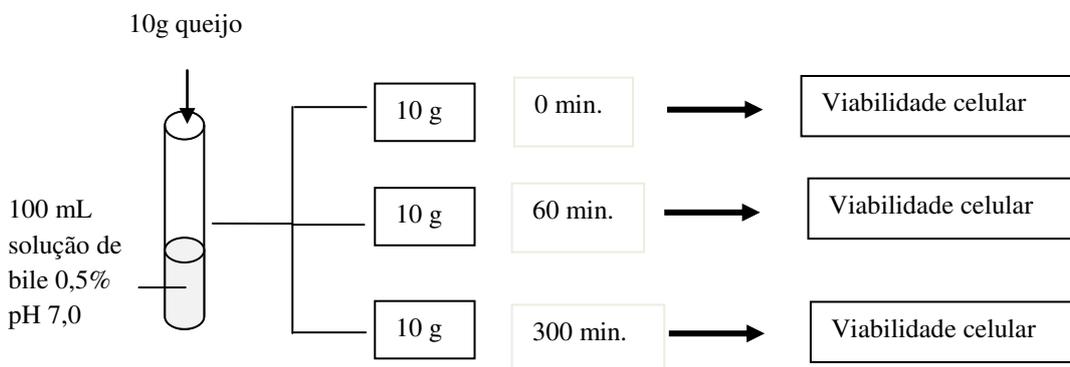


Figura 3 – Representação esquemática da avaliação da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* durante a exposição dos queijos à solução de bile 0,5% em pH 7,0 por 300 minutos.

Para avaliação da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus*, optou-se por pesar as amostras (queijo em SGA), depois de adequada homogeneização, para que a alíquota fosse mais representativa. Assim, uma alíquota de 10 g retirada dos erlenmeyers foi transferida para sacos plásticos para homogeneização de amostras e adicionada de NaHCO₃ 1N para neutralização do pH. Para rompimento das cápsulas e liberação dos micro-organismos, foram adicionados 90 mL de citrato de sódio (2 % p/v) pH 7,0, e a amostra foi submetida a agitação em *Stomacher*, por 5 minutos em velocidade média. Seguiu-se a diluição em água peptonada 0,1% e plaqueamento em profundidade utilizando ágar MRSS, com incubação a 45°C por 72 horas em condições de anaerobiose. A avaliação da viabilidade do micro-organismo após a exposição à bile seguiu o mesmo procedimento, não sendo necessário realizar a neutralização da amostra.

2.6. Delineamento experimental e análise estatística dos dados

O delineamento experimental utilizado foi o de parcelas subdivididas (*Split-Plot*) e o experimento completo foi repetido três vezes. O fator principal foi o tratamento (forma de veiculação do micro-organismo - 3 níveis de variação), e o fator secundário o tempo de armazenamento (5 níveis de variação). O efeito dos tratamentos, do tempo de armazenamento, bem como das interações desses fatores sobre as características dos queijos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey de comparações de médias, considerando um nível de significância de 5%.

Para avaliação da sobrevivência dos micro-organismos, as médias das contagens foram transformadas em log₁₀ e a avaliação do efeito dos tratamentos e do tempo na sobrevivência do micro-organismo foi avaliada por análise de variância (ANOVA). Quando existiram, as diferenças foram avaliadas por teste de Tukey de comparações de médias, considerando um nível de 5% significância.

A avaliação sensorial dos queijos foi realizada por análise de variância (ANOVA). Quando existiram, as diferenças foram avaliadas por teste de Tukey de comparações de médias, considerando um nível de 5% significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização das microcápsulas contendo *Lactobacillus acidophilus*

Durante a produção das microcápsulas contendo o *Lactobacillus acidophilus*, a viabilidade do micro-organismo foi avaliada nas diferentes etapas, conforme apresentado na Tabela 1. Observou-se que o processo de microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* em pectina utilizando-se a técnica de gelificação iônica com ou sem recobrimento com proteína de soro por coacervação complexa, mostrou-se eficiente, já que não houve perdas na viabilidade do micro-organismo, uma vez que a diferença obtida na contagem do concentrado celular (9,86 log UFC/mL) em relação à contagem obtida nas microcápsulas (em torno de 8 log UFC/g) deve-se ao fator diluição, já que foi adicionada uma porção de 10 mL do concentrado em 500 mL de emulsão de pectina e manteiga para a produção das microcápsulas. A eficiência da microencapsulação do *Lactobacillus acidophilus* também foi observada por Ribeiro (2011), na produção do mesmo tipo de microcápsulas.

Tabela 1 - Viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* durante a produção das microcápsulas (n=3)

Amostra	Viabilidade (log UFC/g)
Concentrado celular de <i>L. acidophilus</i>	9,86 ± 0,014
Emulsão (solução de pectina + manteiga + concentrado celular)	8,24 ± 0,002
Microcápsulas de pectina	7,99 ± 0,19
Microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro	8,04 ± 0,28

As microcápsulas recém produzidas foram caracterizadas quanto à sua morfologia e observou-se através da microscopia óptica que as microcápsulas apresentaram formato esférico, com gotículas de gordura e micro-organismos (no formato de bastonetes) homogeneamente distribuídos em seu interior (Figura 4). A Figura 5 apresenta a microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro, onde observou-se uma microcápsula parcialmente

rompida. É possível observar gotículas de gordura distribuídas por toda a microcápsula e a presença de micro-organismos em seu interior (Figura 5 B).

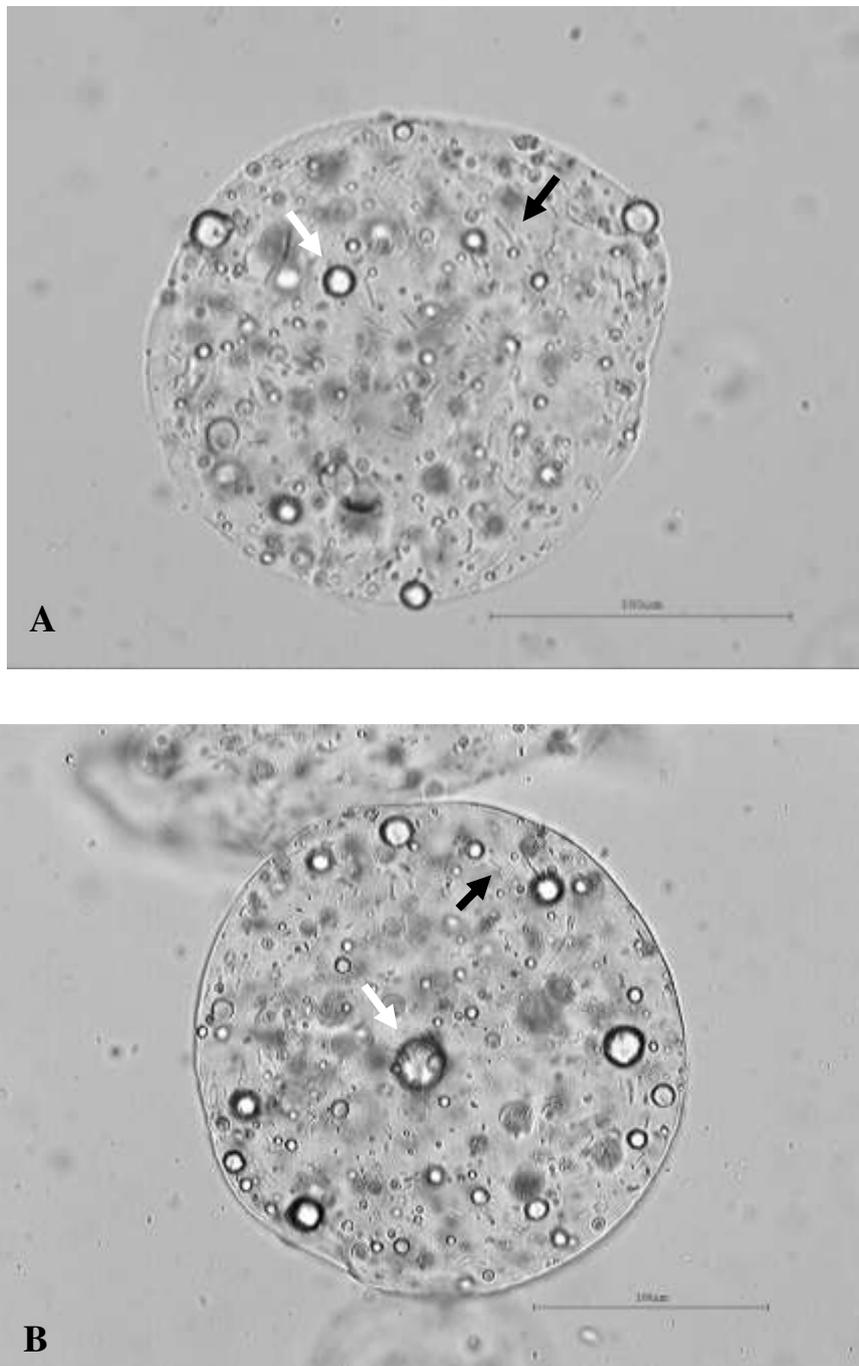


Figura 4 - Morfologia das microcápsulas recém-produzidas obtida por microscopia óptica. **A:** Microcápsula de pectina; **B:** Microcápsula de pectina recobertas com proteína de soro. Setas claras indicam as gotículas de gordura e setas escuras indicam *Lactobacillus acidophilus*. Barra = 100 µm.

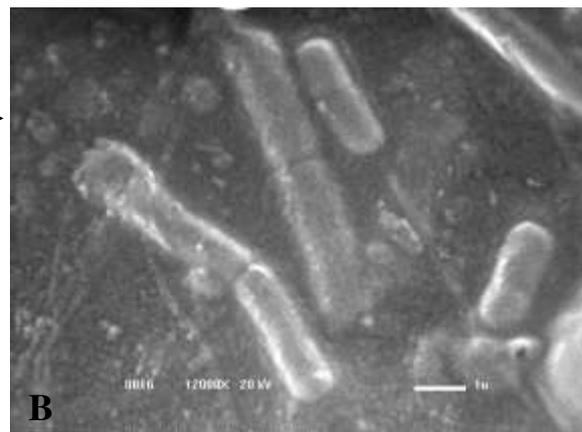
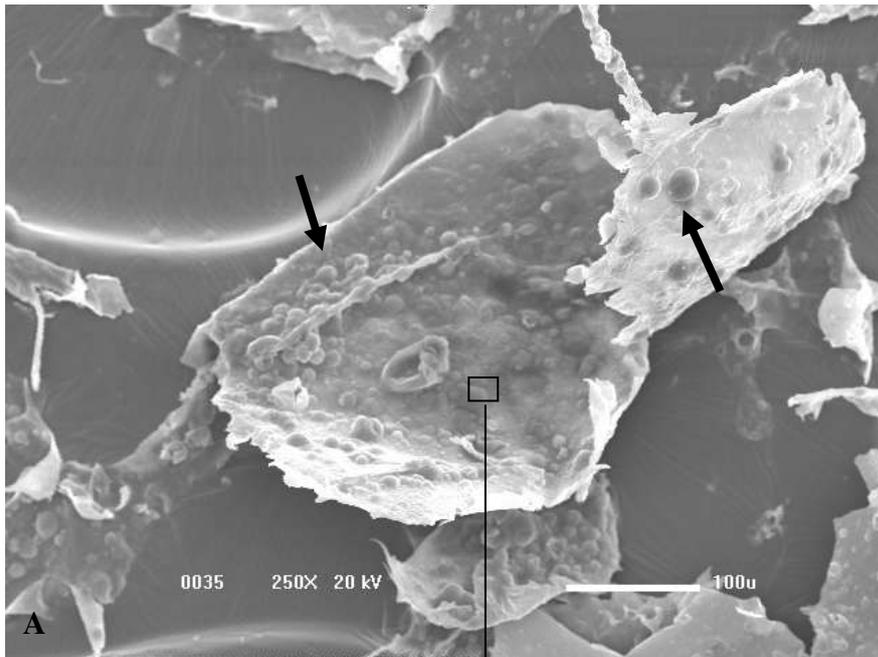


Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro. A: Microcápsula parcialmente rompida. As setas indicam as gotículas de gordura. Barra = 100 μm . B: Presença de bastonetes na superfície interna das microcápsulas. Barra = 1 μm .

A composição físico-química das microcápsulas recém produzidas é apresentada na Tabela 2. As micropartículas não apresentaram diferença significativa em relação aos teores de umidade, lipídeos e em relação ao tamanho médio. Os teores de umidade foram semelhantes (95,11% para microcápsulas de pectina e 96,28% para microcápsulas de pectina recobertas com proteína do soro após tratamento térmico). Da mesma forma não houve diferença em relação ao tamanho médio, evidenciando que o recobrimento com as proteínas do soro não resulta em aumento das microcápsulas.

Tabela 2 - Caracterização físico-química das microcápsulas recém-produzidas (n=3).

	¹ Microcápsulas _{PEC}	² Microcápsulas _{PEC+PS-TT}	p
Umidade (%)	95,22 ± 0,3 ^a	96,95 ± 0,81 ^a	0,061
Nitrogênio (% na matéria seca)	1,25 ± 0,21	4,52 ± 0,84	-
Proteína (% na matéria seca)	-	23,11 ± 5,69	-
Lipídeos (% na matéria seca)	37,18 ± 2,85 ^a	32,30 ± 5,86 ^a	0,423
Tamanho médio (µm)	268,30 ± 12,37 ^a	248,72 ± 54,29 ^a	0,660

¹Microcápsulas_{PEC}: microcápsula de pectina; ²Microcápsulas_{PEC+PS-TT}: microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro tratada termicamente. a, b – entre os tratamentos, letras minúsculas diferentes na mesma linha, apresentam diferença significativa (p<0,05).

3.2. Fabricação do queijo Prato adicionado de *Lactobacillus acidophilus* La5

3.2.1. Caracterização da matéria-prima

A Tabela 3 apresenta a composição físico-química e microbiológica do leite cru e pasteurizado utilizados nos processamentos. Observa-se que ambos atendem aos padrões exigidos pela IN 62 (BRASIL, 2011) quanto aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos, e que o leite foi pasteurizado adequadamente, apresentando resultados negativos para a atividade da fosfatase alcalina (leite pasteurizado) e positivos para a lactoperoxidase.

Tabela 3 - Caracterização físico-química do leite cru e pasteurizado (n=3)

Constituintes	Leite cru	Leite pasteurizado	p
pH	6,80 ± 0,06 ^a	6,73 ± 0,03 ^a	0,310
Acidez (g ac. láctico/100mL)	0,141 ± 0,004 ^a	0,14 ± 0,01 ^a	0,914
Densidade relativa a 15°C (g/mL)	1,032 ± 0,001	nd	nd
Extrato Seco Total (%)	11,95 ± 0,32 ^a	11,55 ± 0,18 ^a	0,297
Gordura (g/100g)	3,05 ± 0,1 ^a	3,05 ± 0,06 ^a	0,742
Cinzas (g/100g)	nd	0,71 ± 0,01	nd
Proteína total (g/100g)	2,97 ± 0,1 ^a	3,02 ± 0,27 ^a	0,723
Caseína (g/100g)	nd	2,31 ± 0,23	nd
Atividade da fosfatase alcalina	Positiva	Negativa	nd
Atividade da lactoperoxidase	Positiva	Positiva	nd
Contagem Bacteriana Total (log UFC/mL)	4,08 ± 0,29 ^a	2,61 ± 0,06 ^b	0,003
Micro-organismos psicrotróficos (log UFC/mL)	2,48 ± 0,07 ^a	< 2 ^b	<0,001

nd – não determinado

3.2.2. Caracterização físico-química e microbiológica dos queijos

A Tabela 4 apresenta a composição físico-química dos queijos adicionados de *Lactobacillus acidophilus* La5. Observou-se que os queijos produzidos apresentaram composição típica de queijo Prato, conforme estabelecido na Portaria 358 (BRASIL, 1997) e segundo Furtado e Lourenço Neto (1994). Não foram observadas diferenças em relação ao pH, acidez (% ácido láctico), Extrato Seco Total, e aos teores de gordura, cinzas, sal, proteína total e caseína. Esse resultado era esperado, uma vez que todos os queijos foram produzidos a partir de uma única massa, que foi dividida no momento da dessoragem e então adicionada do probiótico em diferentes formas. Tais valores são semelhantes aos obtidos por Henrique (2004), Spadoti et al. (2004) e Silveira (2009) para composição físico-química de queijo Prato tradicional. Os resultados indicam que a adição das microcápsulas na proporção de 10% (p/p) à massa dos queijos não afetou sua composição.

Tabela 4 - Caracterização físico-química dos queijos adicionados de *Lactobacillus acidophilus* La5 logo após a fabricação (n=3).

Constituintes	Queijo Prato com La5 livre	Queijo Prato com Microcápsulas _{PEC} ¹	Queijo Prato com Microcápsulas _{PEC+PS-TT} ²	p
pH	5,28 ± 0,09 ^a	5,30 ± 0,13 ^a	5,27 ± 0,09 ^a	0,550
Acidez (% acidez titulável)	0,81 ± 0,22 ^a	0,77 ± 0,20 ^a	0,92 ± 0,12 ^a	0,344
Extrato Seco Total (%)	59,70 ± 1,03 ^a	59,64 ± 0,85 ^a	58,82 ± 0,46 ^a	0,188
Gordura (%)	31,83 ± 2,60 ^a	30,92 ± 1,88 ^a	30,78 ± 1,54 ^a	0,138
Cinzas (%)	4,11 ± 0,28 ^a	4,19 ± 0,19 ^a	4,09 ± 0,40 ^a	0,805
Sal (%)	1,67 ± 0,20 ^a	1,88 ± 0,04 ^a	1,81 ± 0,25 ^a	0,315
Proteína total (%)	23,53 ± 0,25 ^a	23,37 ± 0,46 ^a	22,82 ± 0,66 ^a	0,298
Caseína (%)	22,83 ± 0,10 ^a	22,64 ± 0,75 ^a	22,15 ± 0,93 ^a	0,416

¹Microcápsulas_{PEC}: microcápsula de pectina; ²Microcápsulas_{PEC+PS-TT}: microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro tratada termicamente.

Na Tabela 5 estão apresentadas as contagens de micro-organismos probióticos e do fermento láctico presentes nos queijos. A porção recomendada para queijo Prato pela ANVISA (BRASIL, 2003) é de 30 g, e a Comissão de Assessoramento Técnico-científico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos (BRASIL, 1999), considera que a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 8 a 9 log de UFC na porção recomendada do produto pronto para o consumo (BRASIL, 2008). Desta forma, as populações de *L. acidophilus* nos queijos com La5 livre, queijo com microcápsulas de pectina e queijo com microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro são de 7,43; 7,10 e 6,89 log UFC por porção de 30 g de queijo, respectivamente, ficando abaixo do estabelecido pela legislação brasileira. Esses resultados foram obtidos através da contagem em ágar MRSS, que foi considerado seletivo para *L. acidophilus* anteriormente. A contagem mais baixa do que o esperado provavelmente ocorreu devido a uma perda não prevista de microcápsulas e do micro-organismo livre no momento da fabricação dos queijos, uma vez que a proporção de micro-organismos adicionada foi calculada para que os queijos tivessem contagens de 7

log UFC/g. Já em relação ao *Lactococcus lactis*, não houve diferença entre os queijos, o que era esperado, uma vez que todos os queijos partiram da mesma massa, que foi produzida a partir de uma única batelada onde foi adicionada essa cultura ao leite.

Tabela 5 - Caracterização microbiológica dos queijos adicionados de *Lactobacillus acidophilus* La5 logo após a fabricação (n=3).

Viabilidade	Queijo Prato com La5 livre	Queijo Prato com Microcápsulas _{PEC} ¹	Queijo Prato com Microcápsulas _{PEC+PS-TT} ²	p
<i>L. acidophilus</i> La5 ³ (log UFC/g)	5,96 ± 0,34 ^a	5,63 ± 0,29 ^a	5,41 ± 0,25 ^a	0,267
<i>L. acidophilus</i> La5 ³ (log UFC/30 g)	7,43	7,10	6,89	-
<i>Lactococcus lactis</i> ⁴ (log UFC/g)	9,91 ± 0,21 ^a	9,68 ± 0,09 ^a	9,61 ± 0,14 ^a	0,233

¹Queijo Prato probiótico adicionado de *Lactobacillus acidophilus* La5 microencapsulado por gelificação iônica com pectina. ²Queijo Prato probiótico adicionado de *Lactobacillus acidophilus* La5 microencapsulado por gelificação iônica com pectina recoberto com proteína de soro tratada termicamente. ³Contagem em ágar MRS adicionado de 10% de sorbitol como única fonte carboidrato, incubado a 45°C por 72 h em anaerobiose. ⁴Contagem em ágar M17 adicionado de 5% de solução de lactose 10% (p/v) incubado a 30°C por 72 horas em aerobiose.

3.2.3. Efeito dos tratamentos e do tempo sobre as características de maturação do queijo Prato

Observa-se na Tabela 6 que os tratamentos (Queijo Prato com La5 livre, Queijo Prato com microcápsulas de pectina e Queijo Prato com microcápsulas de pectina recobertas com proteína do soro) não afetaram significativamente o pH, a acidez, a % do nitrogênio solúvel em pH 4,6 (%NT), a % do nitrogênio solúvel em TCA 12% (%NT) e a textura dos queijos. Os queijos adicionados de La5 livre, em microcápsulas de pectina e em microcápsulas de pectina recobertas com proteína do soro apresentaram valores médios de pH de 5,26 ± 0,05; 5,26 ± 0,06 e 5,26 ± 0,05 e de % de acidez titulável de 0,90 ± 0,17; 0,93 ± 0,19 e 0,97 ± 0,13, respectivamente. Os valores médios

da % do NS-pH 4,6 (%NT) foram de $9,98 \pm 4,06$; $9,83 \pm 3,91$ e $10,07 \pm 3,7$ e da % NS-TCA12% (%NT) foram de $3,77 \pm 1,61$; $4,16 \pm 1,7$ e $4,41 \pm 1,56$ para os queijos adicionados de La5 livre, em microcápsulas de pectina e em microcápsulas de pectina recobertas com proteína do soro, respectivamente. Já os valores médios de firmeza (g) para os mesmos queijos foram: $3202,2 \pm 659,5$; $3313,2 \pm 773,3$ e $2961,1 \pm 587,1$.

O pH dos queijos não foi afetado pelo tempo de armazenamento (Tabela 6), entretanto os outros fatores citados foram afetados pelo tempo, conforme apresentado nas Figuras 6 a 8. O NS-pH 4,6 (%NT), que avalia a degradação da caseína, apresentou valores semelhantes aos obtidos em estudos com queijo Prato tradicional, como no estudo de Silveira (2009), e inferiores aos obtidos por Narimatsu et al. (2003). Os valores de NS-TCA 12% (%NT) foram semelhantes aos obtidos para queijo Prato tradicional obtidos por Narimatsu et al. (2003), Spadoti et al. (2005), Barros et al. (2006) e Silveira (2009).

Tabela 6 - Resumo da Análise de Variância (ANOVA). Efeito do tratamento, do tempo e da interação tratamento x tempo sobre o pH, acidez, % do nitrogênio solúvel em pH 4,6 (%NT), % do nitrogênio solúvel em TCA 12% (%NT) e firmeza dos queijos.

Fator de variação	Valores de p					
	GL	pH	Acidez (% acidez titulável)	NS-pH 4,6/(%NT)	NS-TCA 12%(%NT)	Firmeza (g)
Tratamento*	2	0,594	0,174	0,927	0,174	0,052
Tempo**	4	0,434	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Tratamento x Tempo	8	0,993	0,858	0,929	0,939	0,249

*Tratamentos: Queijo Prato com La5 livre, Queijo Prato com microcápsulas de pectina e Queijo Prato com microcápsulas de pectina recobertas com proteína do soro. **Tempo: 1, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento refrigerado

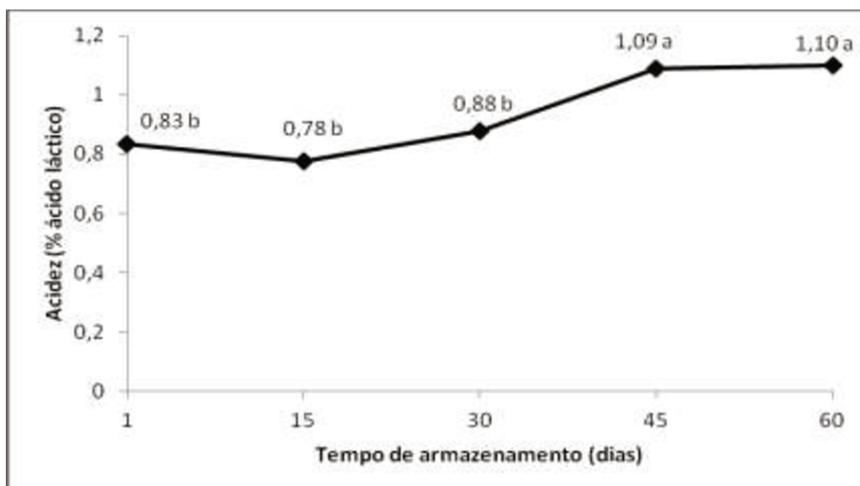


Figura 6 - Efeito do tempo de armazenamento sobre a acidez titulável dos queijos adicionados de *Lactobacillus acidophilus* La5 (média dos 3 tratamentos) (n=3). a, b – ao longo do tempo de armazenamento, letras minúsculas diferentes, apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

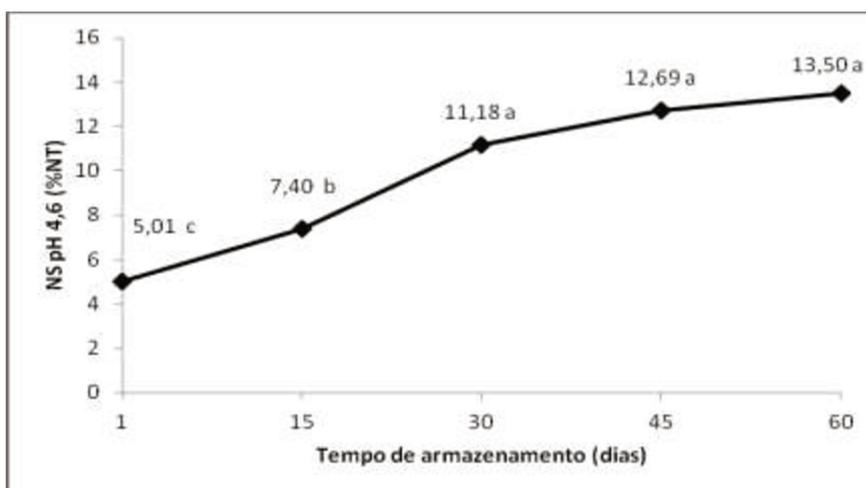


Figura 7 - Efeito do tempo de armazenamento sobre a proteólise dos queijos adicionados de *Lactobacillus acidophilus* La5 (média dos 3 tratamentos), avaliando o NS-pH 4,6 (%NT) (n=3). a, b, c – ao longo do tempo de armazenamento, letras minúsculas diferentes, apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

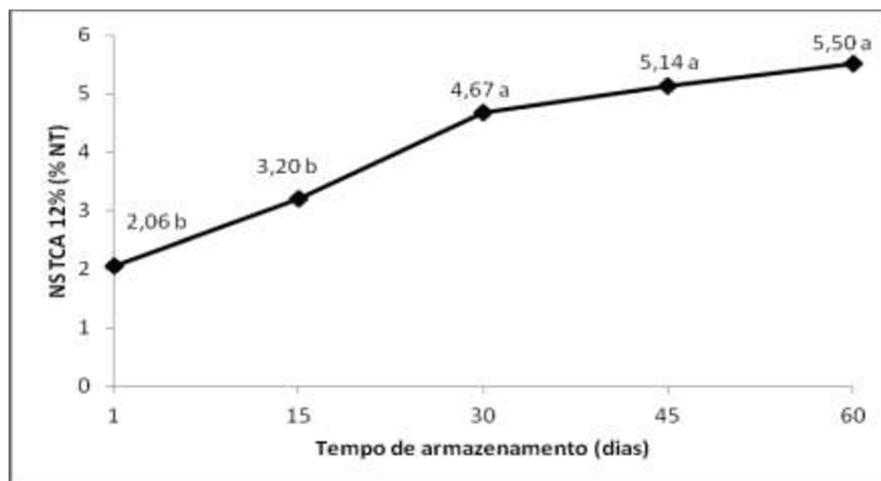


Figura 8 - Efeito do tempo de armazenamento sobre a proteólise dos queijos adicionados de *Lactobacillus acidophilus* La5 (média dos 3 tratamentos), avaliando o NS-TCA 12% (%NT) (n=3). a, b – ao longo do tempo de armazenamento, letras minúsculas diferentes, apresentam diferença significativa (p<0,05).

O aumento dos compostos nitrogenados, resultantes da degradação das proteínas do queijo era esperado, uma vez que a caseína é inicialmente hidrolisada pelo coagulante residual, o que gera o aumento do NS pH 4,6, enquanto que os peptídeos gerados são hidrolisados por peptidases produzidas pelos micro-organismos presentes, como os do fermento láctico, da cultura probiótica adicionada ou das NSLAB, resultando no aumento de pequenos peptídeos e aminoácidos livres, o que gera o aumento do NS TCA 12%.

Embora seja reportada na literatura a produção de aminopeptidases, dipeptidases e proteinases intracelulares pelo *L. acidophilus* (KHALID e MARTH, 1990; SHIHATA e SHAH, 2000; UPADHYAY et al., 2004), levando à hipótese de que este micro-organismo pode contribuir para o aumento da proteólise secundária nos queijos (BERGAMINI et al., 2009), não foi observada maior proteólise nos queijos adicionados de *L. acidophilus* livre, quando comparados aos adicionados de micro-organismos na forma microencapsulada, uma vez que os tratamentos não afetaram significativamente a proteólise dos queijos.

A degradação proteica que ocorre ao longo do tempo também pode ser observada através do perfil eletroforético dos queijos, apresentado na Figura 9, onde

pode-se visualizar a degradação da fração α_{S1} -caseína, com formação de α_{S1-I} -caseína, após 15 dias de armazenamento a 12°C, que ocorreu de maneira semelhante para os tratamentos. Esse resultado está de acordo com o aumento dos teores de NS-pH 4,6 (%NT), observados na Figura 7. Isso era esperado para o queijo Prato, uma vez que a quimosina residual hidrolisa a α_{S1} -caseína durante os estágios iniciais da maturação, na ligação Phe23-Phe24, resultando na formação do peptídeo α_{S1} -CN f24-199 (α_{S1-I} -caseína) e do peptídeo α_{S1} -CN f1-23. Esse peptídeo formado (α_{S1} -CN f1-23) é rapidamente hidrolisado pelas proteases do fermento láctico (FOX et al., 2000; UPADHYAY et al., 2004). O mesmo comportamento de hidrólise da α_{S1} -CN foi observado para queijo Prato tradicional nos estudos de Gorostiza et al. (2004), Silveira (2009) e Merheb-Dini et al. (2012). Observa-se também que, para todos os tratamentos praticamente não houve degradação da β -caseína durante os 60 dias de armazenamento. Estes resultados evidenciam que a microencapsulação do *Lactobacillus acidophilus* não afetou o comportamento de maturação do queijo Prato probiótico quando comparado com a veiculação do micro-organismo livre.

De acordo com os resultados obtidos a partir dos teores de NS-pH 4,6 (%NT) e do perfil eletroforético dos queijos, observa-se um aumento da proteólise ao longo do tempo, que também atua na redução da firmeza do queijo, que se traduz pelo seu amaciamento. A Figura 10 mostra o perfil de firmeza dos queijos probióticos ao longo dos 60 dias de armazenamento refrigerado, que somente foi afetado pelo tempo (Tabela 6). Observou-se uma redução da firmeza dos queijos ao longo do tempo, o que era esperado, devido à proteólise que ocorre no queijo Prato.

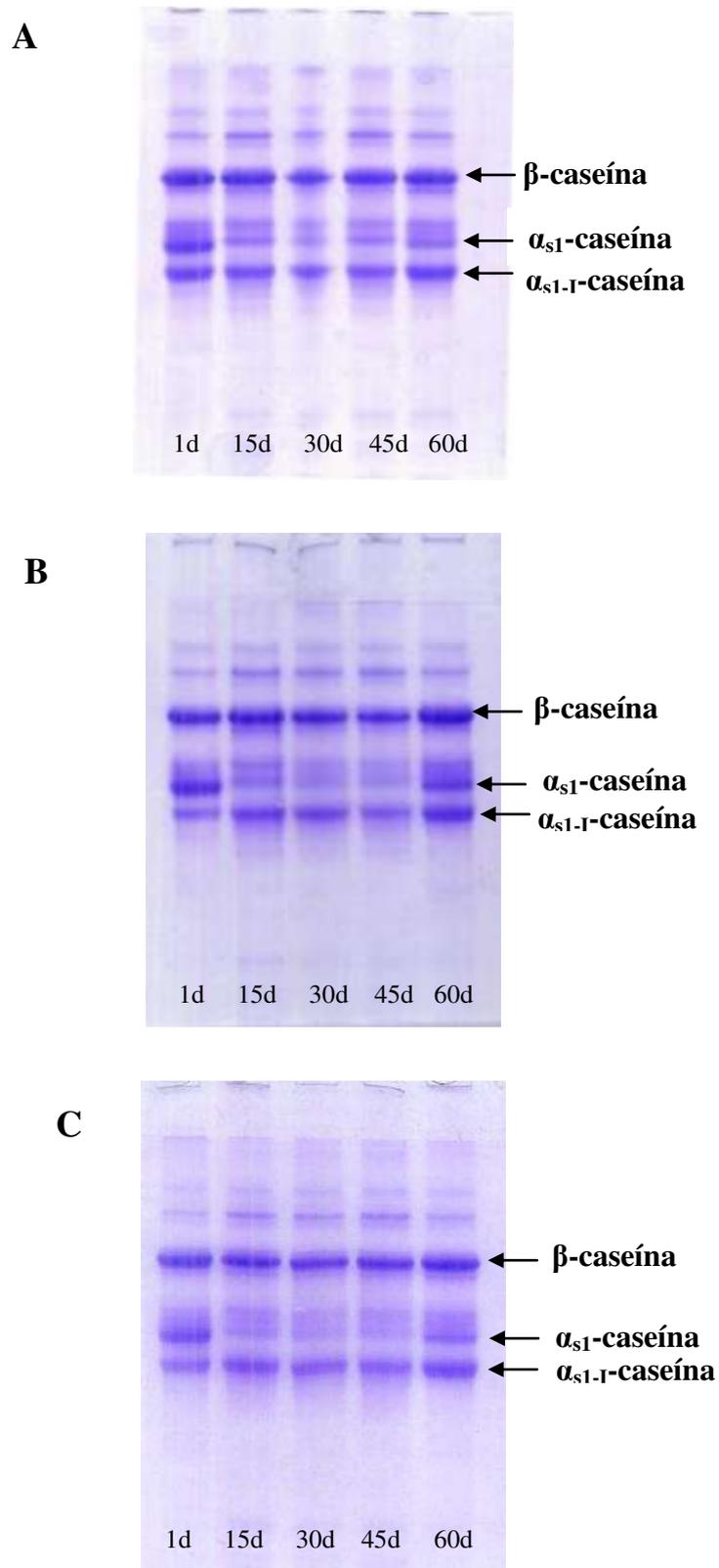


Figura 9 - Perfil eletroforético dos queijos probióticos ao longo de 60 dias de armazenamento refrigerado. **A:** Queijo Prato com La5 livre; **B:** Queijo Prato com microcápsulas de pectina; **C:** Queijo Prato com microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro.

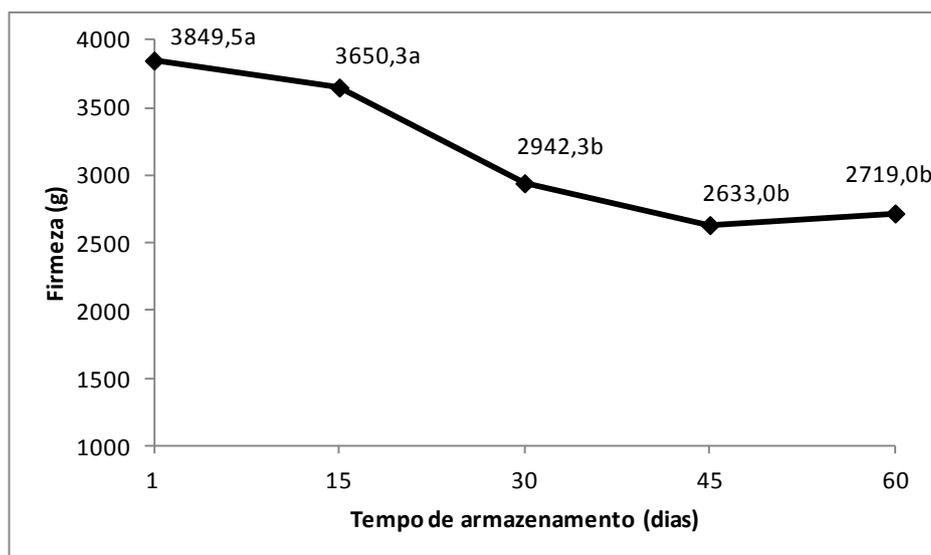


Figura 10 - Efeito do tempo de armazenamento sobre a firmeza dos queijos adicionados de *Lactobacillus acidophilus* La5 (média dos 3 tratamentos) (n=3). a, b – ao longo do tempo de armazenamento, letras minúsculas diferentes, apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

As Figuras 11 a 13 apresentam as microestruturas dos queijos probióticos aos 30 dias de armazenamento refrigerado. Observou-se nos três queijos uma estrutura esponjosa, constituída de uma rede tridimensional de proteína contínua, apresentando espaços vazios distribuídos uniformemente, referentes aos glóbulos de gordura que foram extraídos durante o preparo da amostra. Na Figura 11, que mostra a microestrutura do queijo Prato adicionado de La5 livre, pode-se observar a presença dos micro-organismos adicionados aos queijos, na forma de cocos (Fig. 11 B) ou bastonetes (Fig. 11 C). Nas Figuras 12 e 13, que mostram as microestruturas do Queijo Prato com Microcápsulas_{PEC} e do Queijo Prato com Microcápsulas_{PEC+PS-TT}, respectivamente, observa-se a presença de microcápsulas na rede proteica, como estruturas esféricas, de aspecto distinto dos outros constituintes do queijo. Na Figura 13 também observa-se uma microcápsula presa à rede proteica, provavelmente devido à presença de proteínas do soro em sua superfície, que possui capacidade de se ligar às proteínas dos queijos.

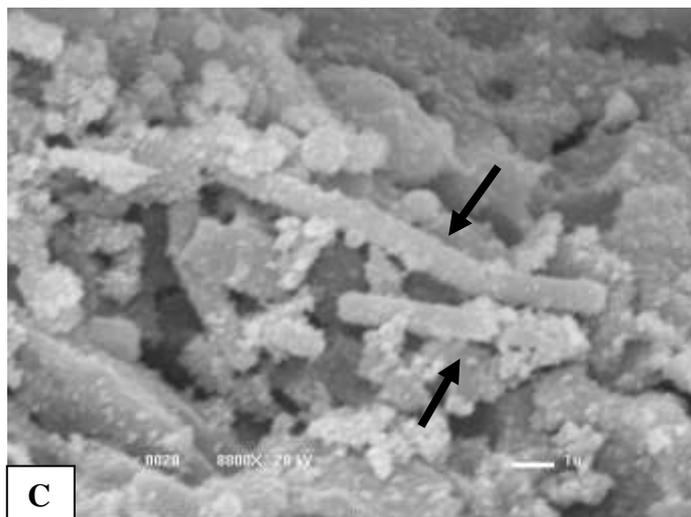
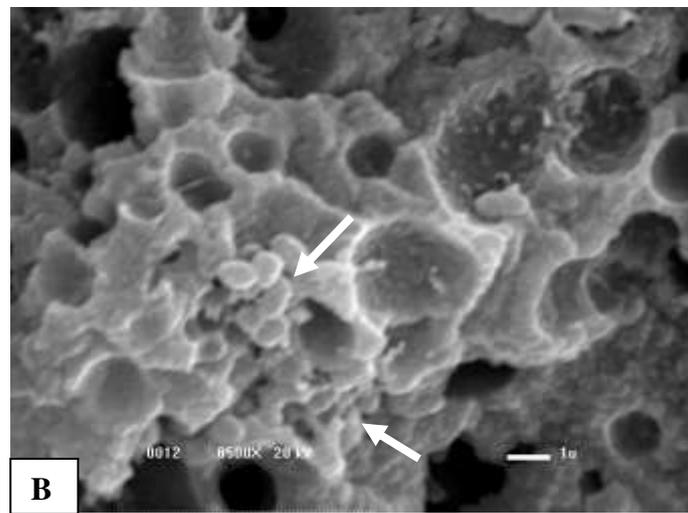
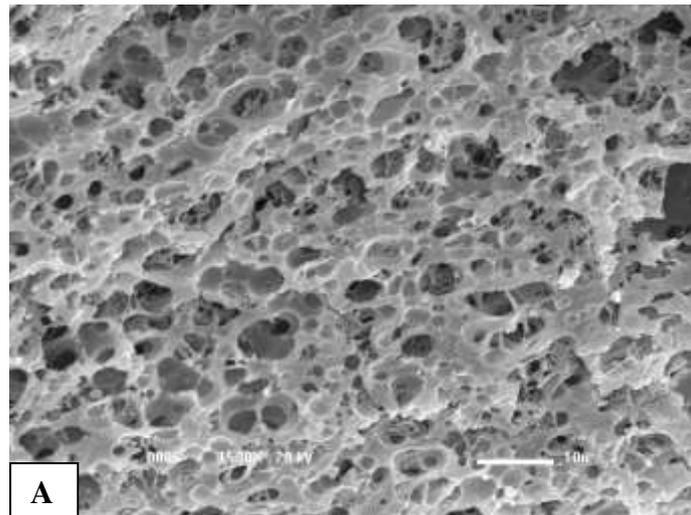


Figura 11 - Microestrutura do queijo Prato adicionado de La5 livre. **A:** Rede proteica com espaços vazios, antes ocupados pela gordura. Barra = 10 μm **B:** Presença de micro-organismo com morfologia de cocos (setas brancas). Barra = 1 μm; **C:** Presença de micro-organismos com morfologia de bastonetes (setas pretas). Barra = 1 μm.

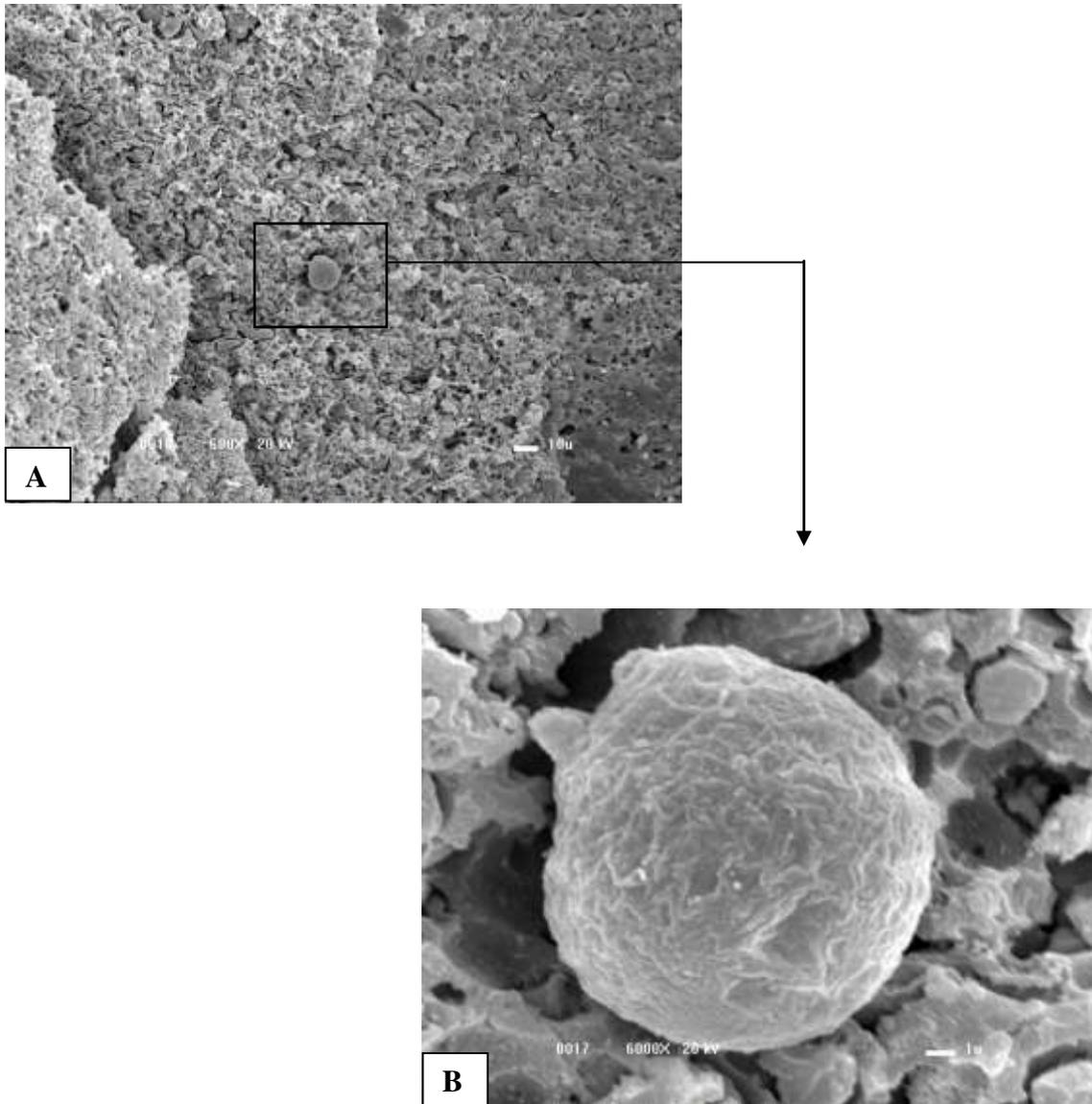


Figura 12 - Microestrutura do queijo Prato com microcápsulas de pectina. **A:** Rede proteica com espaços vazios, antes ocupados pela gordura e contendo microcápsulas. Barra = 10 µm; **B:** Visualização da microcápsula de pectina na matriz proteica. Barra = 1µm.

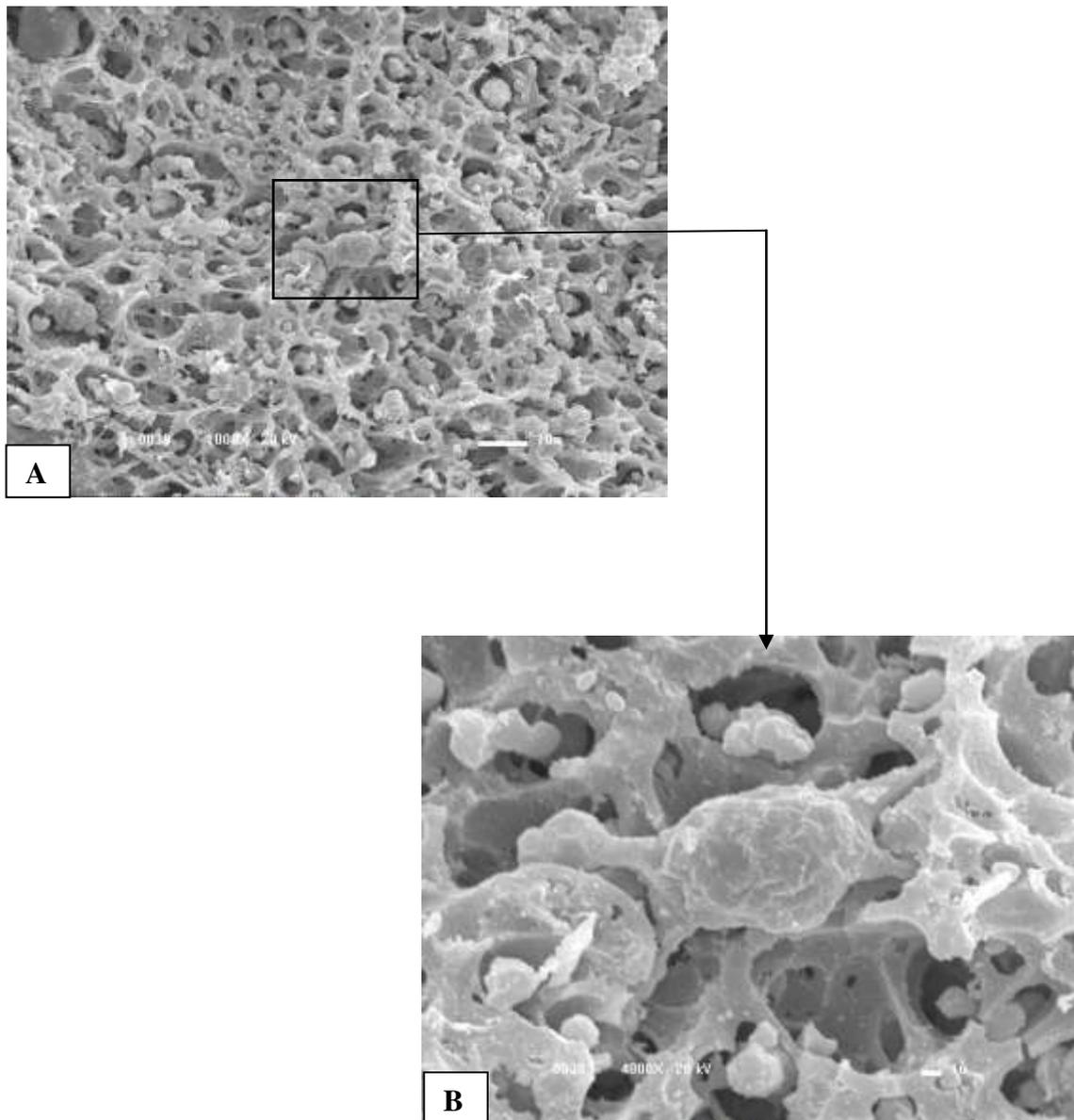


Figura 13 - Microestrutura do queijo Prato com microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro. **A:** Rede proteica com espaços vazios, antes ocupados pela gordura e contendo microcápsulas. Barra = 10 µm; **B:** Visualização da microcápsula de pectina recoberta com proteína de soro, presa à rede proteica. Barra = 1 µm.

3.2.4. Análises microbiológicas dos queijos

Os tratamentos, ou seja, a forma de veiculação do probiótico, e o tempo de armazenamento afetaram significativamente a viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* La5 e do *Lactococcus lactis*, que, no entanto, não foi afetada pela interações destes fatores (Tabela 7). A contagem de *Lactobacillus acidophilus* foi maior no Queijo Prato com La5 livre ($5,62 \pm 0,77$ UFC/g de queijo) do que nos queijos com o microorganismo encapsulado, os quais não diferiram entre si e apresentaram contagens de $5,19 \pm 0,44$ no Queijo Prato com Microcápsulas_{PEC} e de $5,10 \pm 0,49$ UFC/g de queijo no Queijo Prato com Microcápsulas_{PEC+PS-TT}, respectivamente. Provavelmente essa diferença na viabilidade do *L. acidophilus* esteja relacionada à maior perda de microcápsulas durante a fabricação dos queijos, em relação à cultura livre, resultando em maior viabilidade.

Tabela 7: Resumo da Análise de Variância (ANOVA). Efeito dos tratamentos, do tempo de armazenamento e da interação desses fatores sobre as contagens *Lactobacillus acidophilus* e *Lactococcus lactis*.

Fator de variação	GL	Valores de p	
		Contagem de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Contagem de <i>Lactococcus lactis</i>
Tratamento ¹	2	0,010	< 0,001
Tempo ²	4	< 0,001	< 0,001
Tratamento x Tempo	8	0,973	0,506

¹ Tratamentos: Queijo Prato probiótico adicionado de *Lactobacillus acidophilus* La5 livre; Queijo Prato probiótico adicionado de microcápsulas de pectina; Queijo Prato probiótico adicionado de microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro. ² Tempo: 1, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento após processamento.

Independente da forma de veiculação (livre ou microencapsulado) a contagem do *Lactobacillus acidophilus* diminuiu durante o armazenamento (Figura 14), evidenciando que a microencapsulação não conferiu efeito protetivo adicional ao probiótico. Entretanto, observa-se que a população de *Lactobacillus acidophilus* nos queijos manteve-se constante durante os primeiros 45 dias e apresentou redução de 0,86

ciclos logarítmicos nos últimos 15 dias de armazenamento, embora estes valores estejam abaixo da quantidade exigida para o produto ser considerado probiótico. Por outro lado, o *Lactococcus lactis*, micro-organismo proveniente de cultura láctica, manteve altas contagens (8,63 log UFC/g de queijo) durante os 60 dias de armazenamento (Figura 14), apesar de ter diminuído gradativamente ao longo de tempo. Isso sugere que o queijo Prato, por si só, é um bom veículo para os micro-organismos probióticos, com pequenas perdas ao longo do armazenamento refrigerado. A manutenção da viabilidade do micro-organismo probiótico em queijos maturados durante o armazenamento refrigerado também foi observado por Ong et al. (2006, 2007), Ong e Shah (2008, 2009), Özer et al. (2008, 2009), Bergamini et al. (2009) e Oberg et al. (2011).

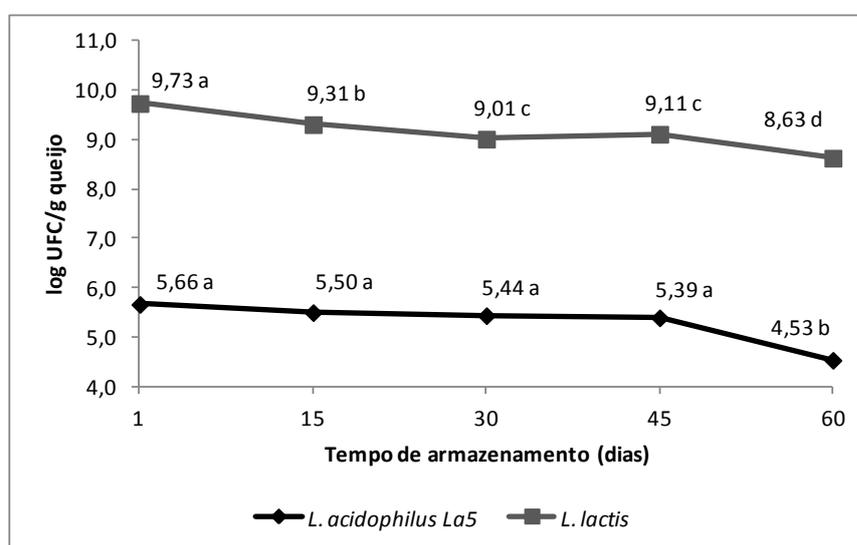


Figura 14: Efeito do tempo de armazenamento sobre as contagens de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactococcus lactis* no queijo Prato. Para cada micro-organismo, letras minúsculas diferentes ao longo do tempo de armazenamento apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

A análise das culturas puras de *Lactobacillus acidophilus* La5 e *Lactococcus lactis* com os diferentes meios confirma a efetividade dos meios utilizados, uma vez que o *Lactobacillus acidophilus* La5 somente se desenvolveu em ágar MRSS e o *Lactococcus lactis* em ágar M17 (Tabela 8)

Tabela 8 - Contagens de micro-organismos (em log UFC/mL) obtidas nas culturas puras de *Lactobacillus acidophilus* La5 e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* com diferentes meios de cultura (n=15)

Meios de cultura	Contagens nas culturas puras (log UFC/mL)	
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. lactis</i>
Ágar MRSS ¹	9,40 ± 0,25	< 2
Ágar M17 ²	< 2	9,45 ± 0,25

Ágar MRSS¹: ágar MRS adicionado de sorbitol incubado a 45°C/72 horas em anaerobiose; Ágar M17²: ágar M17 adicionado de lactose incubado a 30°C/72 horas em aerobiose.

3.3. Avaliação da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* nos queijos durante exposição a condições que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal

A exposição dos queijos ao suco gastrointestinal artificial após 30 dias de armazenamento indicou que os tratamentos, ou seja, a veiculação do *Lactobacillus acidophilus* livre ou encapsulado, afetaram significativamente a viabilidade dos micro-organismos ($p = 0,004$), que não foi afetada pelo tempo de exposição ao suco gastrointestinal artificial ($p = 0,948$) nem pela interação tratamento x tempo ($p = 0,851$). Independente do tempo de exposição, a viabilidade média do *Lactobacillus acidophilus* no Queijo Prato com La5 livre foi maior ($4,40 \pm 0,08$ UFC/g de queijo) do que no Queijo Prato com Microcápsulas_{PEC} ($3,94 \pm 0,06$ UFC/g de queijo), entretanto não diferiu do Queijo Prato com Microcápsulas_{PEC+PS-TT} ($4,18 \pm 0,13$ UFC/g de queijo). Esse fato provavelmente ocorreu devido à maior viabilidade do *L. acidophilus* no Queijo Prato com La5 livre. Os resultados da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* nos queijos durante a exposição ao suco gastrointestinal (SGA) estão mostrados na Figura 15. Observou-se que durante a exposição a SGA pH 3,0 por 120 minutos e sequencialmente a SIA pH 7,0 por mais 300 minutos, a população do *Lactobacillus acidophilus* não apresentou reduções significativas. Os resultados são semelhantes aos encontrados por Vinderola et al. (2000) que observaram pequena redução da viabilidade de *L. acidophilus* após exposição dos queijos frescos probióticos a pH ácido por 3 horas. Durante a exposição dos queijos à solução de bile 0,5% pH 7,0, a viabilidade do micro-organismo não foi afetada pelos tratamentos, ($p=0,213$), pelo tempo ($p=0,248$) e

nem pela interação entre os dois fatores ($p=0,919$), permanecendo sem reduções significativas durante os 300 minutos de exposição (Figura 16).

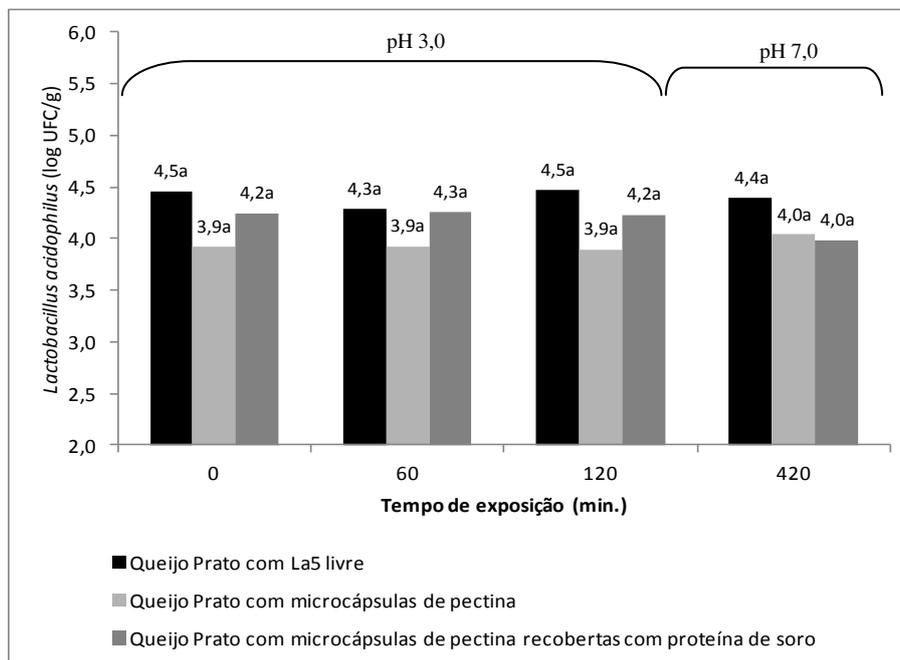


Figura 15: Viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* La5 durante a exposição ao suco gástrico artificial (pH 3,0 por 120 min.) e sequencialmente ao suco intestinal artificial (pH 7,0 por mais 300 min.) (n=3). Para cada tratamento, letras minúsculas diferentes ao longo do tempo de armazenamento apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

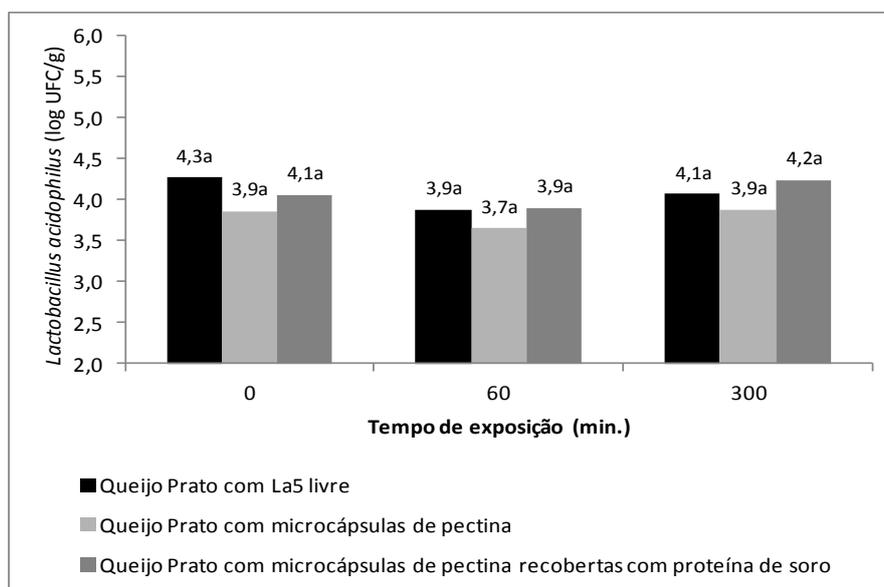


Figura 16 – Viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* durante a exposição a bile 0,5% pH 7,0 por 300 minutos (n=3).

Os resultados sugerem que o queijo Prato é uma matriz adequada para a adição de *Lactobacillus acidophilus*, independente da microencapsulação do micro-organismo, uma vez que permite a manutenção de sua viabilidade ao longo da passagem pelo trato gastrointestinal, protegendo o micro-organismo das condições adversas, permitindo que chegue ao seu sítio de ação sem alterações da população inicial presente no produto. Isso provavelmente é possível pelo alto teor de proteínas e gordura que o queijo possui, já que esses constituintes podem ter efeito protetivo sobre os micro-organismos em condições adversas (PICOT e LACROIX, 2004; LAHTINEN et al., 2007).

Uma consideração deve ser feita ao se observar os resultados, que apresentaram contagens em torno de 4 log UFC/g de queijo: os queijos do presente estudo apresentaram contagens iniciais de *Lactobacillus acidophilus* abaixo do recomendado, e além disso, durante a realização da simulação da passagem pelo trato gastrointestinal há o fator diluição das amostras, já que adiciona-se 10 g de queijo em 100 mL de SGA ou solução de bile. Entretanto, é importante observar que as contagens do micro-organismo probiótico se mantiveram estáveis, sem perdas significativas.

3.4. Avaliação sensorial dos queijos adicionados de *Lactobacillus acidophilus* La5

Os queijos probióticos foram submetidos à avaliação sensorial após 30 dias de armazenamento sob refrigeração. Para que o resultado fosse obtido antes da avaliação sensorial, o padrão microbiológico os queijos foi avaliado logo após sua produção e, conforme mostrado na Tabela 8, todos os queijos atenderam ao padrão estabelecido pela legislação (BRASIL, 2001).

Tabela 8 – Padrão microbiológico dos queijos submetidos à avaliação sensorial

Análises	Queijo Prato com La5 livre	Queijo Prato com Microcápsulas _{PEC} ¹	Queijo Prato com Microcápsulas _{PEC+PS-TT} ²
Coliformes a 30-35°C (NMP/g)*	< 3	< 3	< 3
Coliformes a 45°C (NMP/g)	< 3	< 3	< 3
Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	< 10	< 10	< 10
<i>Salmonella</i> spp (em 25g)	ausente	ausente	ausente
<i>Listeria monocytogenes</i> (em 25 g)	ausente	ausente	ausente

*NMP – Número Mais Provável. ¹Microcápsulas_{PEC}: microcápsula de pectina; ²Microcápsulas_{PEC+PS-TT}: microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro tratada termicamente.

Os queijos adicionados de *Lactobacillus acidophilus* La5 foram avaliados por 100 provadores e as notas médias para cada atributo avaliado são apresentadas na Tabela 9, onde se observa que as mesmas foram altas, estando entre 7 (gostei moderadamente) e 8 (gostei muito), o que se traduz em boa aceitação sensorial, para todos os atributos avaliados, não tendo sido observada diferença significativa entre os queijos em relação à aparência e aroma.

Tabela 9 – Médias dos atributos dos queijos probióticos obtidas pela avaliação sensorial, onde 1 = desgostei extremamente e 9 = gostei extremamente, (n=100)

Atributo	Queijo Prato com La5 livre	Queijo Prato com Microcápsulas _{PEC} ¹	Queijo Prato com Microcápsulas _{PEC+PS-TT} ²	P
Aparência	8,06 ± 0,81 ^a	7,92 ± 1,13 ^a	8,08 ± 0,81 ^a	0,0766
Aroma	7,65 ± 1,08 ^a	7,60 ± 1,28 ^a	7,74 ± 1,1 ^a	0,4632
Sabor	7,57 ± 1,26 ^{ab}	7,31 ± 1,36 ^b	7,72 ± 1,2 ^a	0,0155
Textura	7,61 ± 1,31 ^{ab}	7,26 ± 1,51 ^b	7,72 ± 1,23 ^a	0,0065
Impressão global	7,70 ± 1,9 ^{ab}	7,40 ± 1,25 ^b	7,87 ± 0,98 ^a	0,0012
Intenção de compra*	4,26 ± 0,93 ^a	4,09 ± 0,95 ^a	4,33 ± 0,79 ^a	0,0599

¹Microcápsulas_{PEC}: microcápsula de pectina; ²Microcápsulas_{PEC+PS-TT}: microcápsulas de pectina recobertas com proteína de soro tratada termicamente.*para avaliação da intenção de compra a escala variou de 1 = certamente não compraria este produto a 5 = certamente compraria este produto.

Em relação ao sabor, textura e impressão global, os queijos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), tendo o mesmo comportamento para esses atributos, uma vez que os queijos com microcápsulas de pectina recobertas com proteína do soro apresentaram as melhores notas, não diferindo dos queijos com La5 livre e sendo melhores do que os queijos com microcápsulas de pectina. É possível que a cobertura da partícula com proteínas do soro favoreça sua interação com a matriz proteica do queijo (Figura 13), afetando positivamente a percepção de sabor e textura do produto.

A adição das microcápsulas aos queijos não afetou negativamente a textura dos mesmos, diferente dos resultados obtidos em estudo com adição do mesmo tipo de microcápsula recoberta com proteína do soro em iogurte natural batido, onde houve diferença em relação à textura, quando comparado a iogurte com adição do micro-organismo livre, sendo as microcápsulas perceptíveis aos provadores, o que afetou negativamente o julgamento, (Ribeiro et al., 2012 – dados não publicados). A intenção de compra dos queijos não foi afetada pelos tratamentos, apresentando resultados entre 4 (provavelmente compraria este produto) e 5 (certamente compraria este produto), o que é um resultado satisfatório, indicando que a adição de microcápsulas não afetou as características desejadas pelos consumidores para queijo Prato.

4. CONCLUSÕES

O queijo Prato é um veículo adequado para a adição de micro-organismos probióticos, como o *Lactobacillus acidophilus*, conferindo proteção ao mesmo durante 60 dias de armazenamento refrigerado, e durante a simulação da passagem pelo trato gastrointestinal.

A microencapsulação do *Lactobacillus acidophilus* La5 não conferiu proteção adicional ao micro-organismo quando adicionado ao queijo Prato, pois os micro-organismos adicionados na forma livre não apresentaram maiores perdas de viabilidade em relação ao micro-organismos microencapsulados.

A adição de microcápsulas não afetou as características físico-químicas dos queijos Prato, que apresentaram composição semelhante ao queijo Prato tradicional, com mesmo comportamento durante a maturação, apresentando boa aceitação sensorial.

5. REFERÊNCIAS

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. Washington, 2006.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, 17th. Washington, 2004.

ANDREWS, A.T.. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. **Journal of Dairy Research**, vol. 50, 45–55, 1983

BARROS, C. M. V. **Uso de culturas adjuntas e ultrafiltração para melhoria de sabor e textura de queijo prato com reduzido teor de gordura**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA/UNICAMP, 2005, 211p.

BARROS, C.M.V.; CUNHA, R.C.; GALLINA, D.A.; VIOTTO, L.A.; VIOTTO, W.H. Efeito do uso de cultura adjunta (*Lactobacillus helveticus*) na proteólise, propriedades viscoelásticas e aceitação sensorial de queijo prato light. **Ciência Tecnologia Alimentos**. v.26, n.1, p.11-18, 2006.

BERGAMINI, C. V.; HYNES, E. R.; PALMA, S. B.; SABBAG, N. G. ; ZALAZAR, C. A. Proteolytic activity of three probiotic strain in a semi-hard cheese as single and mixed cultures: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 467-475, 2009.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Portaria nº15 de 30 de abril de 1999, que institui, junto a Câmara Técnica de Alimentos, Comissão de Assessoramento Tecnocientífico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Diário Oficial da União**: Brasília, Distrito Federal, 03 de maio de 1999. Seção 2, página 4, 1999.

BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, que aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**: Brasília, Distrito Federal, em 10 de janeiro de 2001.

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

BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Atualizado em julho de 2008. Disponível em:
http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA. Portaria nº 358, de 04 de setembro de 1997, que aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Prato. **Diário Oficial da União**: Brasília, Distrito Federal, em 08 de setembro de 1997. Seção 1, página 19690. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA – Instrução Normativa nº62, de 29 de setembro de 2011, que altera a IN 51 de 2002 e aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite Cru Refrigerado, do Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**: Brasília, Distrito Federal, em 29 de dezembro de 2011. Seção 1. 2011.

BRITISH STANDARDS INSTITUTION. **Determination of fat content of milk and milk products (Gerber methods). Methods**. London: British Standard Institution, 1989. 12p.

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

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 130-135, 1960.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. 34 p. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. Cheese rheology and texture. In P. F. FOX, T. P. GUINEE, T. M. COGAN, P. L. H. McSWEENEY (Ed.). **Fundamentals of cheese science**. Aspen, Gaithersburg: Aspen. 2000. 587 p.

FRANZ, C. M. A. P.; CHO, G. S.; HOLZAPFEL, W. H. Probiotics: taxonomy and technological features. In: SHAH, N.P.; CRUZ, A.G.; FARIA, J. A. F. (Ed). **Probiotic and Prebiotic Foods: Technology, Stability and Benefits to Humans Health**. 1ª Ed. Nova Science Publishers, Inc., New York, 2011, 545 p.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. **Tecnologia de queijos**. Manual técnico para produção industrial de queijos. São Paulo: Dipemar, 1994. 118 p.

GEREZ, C. L.; FONT DE VALDEZ, G. GIGANTE, M. L.; GROSSO, C. R. F. Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhammnous* CRL 1505 to low pH. **Letter in Applied Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 552–556, 2012.

GOROSTIZA, A.; CICHOSCKI, A. J.; VALDUGA, A. T.; VALDUGA, E.; BERNARDO, A.; FRESNO, J. M. Changes in soluble nitrogenous compounds, caseins and free amino acids during ripening of artisanal Prato cheese; a Brazilian semi-hard cows variety. **Food Chemistry**, v. 85, p. 407-414, 2004.

GROSSO, C. R. F.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yoghurt. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 151-156, 2004.

HENRIQUE, V. S. M. **Comportamento da fase aquosa e efeito do pH sobre a proteólise e propriedades funcionais do queijo Prato**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA/UNICAMP, 2004,133p.

ISO 4831. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms - Most probable number technique. 3ª Ed. The International Organization for Standardization, 2006.

ISO 7251. Microbiology of food and animal stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* – Most probable number technique. 3ªEd. The International Organization for Standardization, 2005.

ISO 11290-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method. The International Organization for Standardization, 1996.

ISO 6785 / IDF 93: milk and milk products – Detection de Salmonella spp. Suíça, 2001.

KHALID, N. M.; MARTH, E. H. Lactobacilli – their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 2669-2684, 1990.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 737-743, 2004.

LAHTINEN S.J.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. J.; FORSELL, P.; MYLLARINEN, P. Effect of starch- and lipid-based encapsulation on the culturability of two *Bifidobacterium longum* strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 500–505, 2007.

LANARA - Secretaria de Defesa Agropecuária. M.A. **Métodos Analíticos Oficiais de Controle de Produtos de origem animal e seus Ingredientes.** II-Métodos Físicos e Químicos. Brasília-DF: Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1981.

MERHEB-DINI, C.; GARCIA, G. A. C.; PENNA, A. L. B.; GOMES, E.; SILVA, R. Use of a new Milk-clotting protease from *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31 as coagulant and changes during ripening of Prato cheese. **Food Chemistry**, v. 130, p. 859-865, 2012.

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

NARIMATSU, A.; DORNELLAS, J.R.F.; SPADOTI, L.M.; PIZAIA, P.D.; ROIG, S.M. Avaliação da proteólise e do derretimento do queijo Prato obtido por ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 177-182, 2003.

OBERG, C. J.; MOYES, L. V.; DOMEK, M. J.; BROTHENSEN, C.; McMAHON, D. J. Survival of probiotic adjunct cultures in cheese and challenges in their enumeration using selective media. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2220-2230, 2011

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N. P. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 446-456, 2006.

- ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N. P. Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium* sp. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 67-78, 2007.
- ONG, L.; SHAH, N. P. Influence of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *L. helveticus* on proteolysis, organic acid profiles, and ACE-inhibitory activity of cheddar cheeses ripened at 4, 8, and 12°C. **Journal of Food Science**, v, 73, n. 3, p. M111-M120, 2008.
- ONG, L.; SHAH, N. P. Probiotic Cheddar cheese: influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. **LWT – Food Science and Technology**, v. 42, p. 1260-1268, 2009.
- ÖZER, B.; UZUN, Y. S.; KIRMACI, H. A. Effect of microencapsulation on viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 during Kasar cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v. 61, n. 3, p. 237-244, 2008.
- ÖZER, B.; KIRMACI, H. A.; SENEL, E.; ATAMER, M.; HAYALOGLU, A. Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 22-29, 2009.
- PICOT, A.; LACROIX, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 505-515, 2004.
- REID, A. A.; CHAMPAGNE, C. P.; GARDINER, N.; FUSTIER, P.; VUILLEMARD, J. C. Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 microentrapped in whey protein gel particles. **Journal of Food Science**, v. 72, n.1, p. M31-M37, 2007.
- RIBEIRO, M. C. E. **Produção e caracterização de iogurte probiótico batido adicionado de *Lactobacillus acidophilus* livre e encapsulado**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA/UNICAMP, 2011, 75p.
- RICHARDSON, G.H.. **Standard methods for examination of dairy products**. American Public Health Association, Washington, 1985.
- ROSS, R. P.; FITZGERALD, G.; COLLINS, K.; STANTON, C. Cheese delivering biocultures – probiotic cheese. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2, p. 71-78, 2002.
- SHIHATA, A.; SHAH, N. P. Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 401-408, 2000.

SILVEIRA, A. C. **Fabricação e avaliação da maturação de queijo Prato obtido a partir de leite pré-acidificado com CO₂ e redução de coagulante.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA/UNICAMP, 2009, 68p.

SPADOTI, L. M.; DORNELLAS, J. R. F.; ROIG, S. M. Evaluation of the microstructure of Prato type cheese obtained by modifications of the traditional manufacturing process. **Milchwissenschaft**, v. 59, n. (3/4), p. 151-155, 2004.

SZCZESNIAK, A.S. Texture is a sensory proper. **Food Quality and Preference** vol. 13 p 215–225, 2002.

TAMIME, A. Y.; KÁLAB, M.; DAVIES, G.; YOUNIS, M. F. Microstructure and firmness of processed cheese manufactured from cheddar cheese and skim milk powder cheese base. **Food Structure**, v. 9, p. 23-37, 1990.

TERZAGHI, B.E., SANDINE, W.E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. **Applied Microbiology**, v. 29, p. 807-813, 1975.

UPADHYAY, V. K.; McSWEENEY, P. L. H.; MAGBOL, A. A. A.; FOX, P. F. Proteolysis in cheese during ripening. In: FOX P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. (Ed.). **Cheese – Chemistry, physics, and microbiology** – vol. 1 – General Aspects. 3^a ed. London, 2004, 617 p.

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

VILLANUEVA, N. D. M.; DA SILVA, M. A. A. P. Comparative performance of the nine-point hedonic, hybrid and self-adjusting scales in the generation of internal preference maps. **Food Quality and Preference**, v. 20, p. 1-12, 2009.

VINDEROLA, C. G.; PROSELLO, W.; Ghiberto, D.; REINHEIMER, J. A. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in argentinian fresco cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1905-1911, 2000.

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

CONCLUSÃO GERAL

Os micro-organismos probióticos adicionados em produtos lácteos, como os queijos, devem ser enumerados seletivamente, através de metodologias previamente testadas, uma vez que a presença de diferentes micro-organismos ou cepas pode comprometer os resultados. Assim para a contagem seletiva de *Lactobacillus acidophilus* La5 em queijo Prato probiótico produzido com adição de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* foi considerado eficiente o ágar MRS adicionado de sorbitol, incubado a 45°C por 72 horas em anaerobiose. Enquanto que para a contagem seletiva do *Lactococcus lactis* foi considerado eficiente o meio M17 adicionado de lactose e incubado a 30°C em aerobiose.

A microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* por gelificação iônica, utilizando pectina como material de parede, recoberto ou não com proteína do soro tratada ou não termicamente, foi realizada com sucesso, sem perdas da viabilidade do probiótico durante o processo. O recobrimento das microcápsulas de pectina com proteína de soro não conferiu proteção adicional ao *Lactobacillus acidophilus* quando exposto a condições que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal

A produção de queijo Prato com adição de *Lactobacillus acidophilus* La5 livre ou microencapsulado é viável, uma vez que a adição do micro-organismo não altera as características típicas do produto. Entretanto, a aplicação da microencapsulação com o objetivo de proteger o *Lactobacillus acidophilus* La5 no queijo não foi eficiente, pois os micro-organismos na forma livre não apresentaram maiores perdas de viabilidade em relação aos microencapsulados. Todavia, o queijo Prato é um veículo adequado para a adição de *L. acidophilus*, uma vez que conferiu proteção ao mesmo durante 60 dias de armazenamento refrigerado, e durante a simulação da passagem pelo trato gastrointestinal.

ANEXO 1

Curva de crescimento do *Lactobacillus acidophilus* La5

Cultura stock congelada (em leite em pó desnatado reconstituído com adição de glicerol) de *Lactobacillus acidophilus* La5 (Christian Hansen, Valinhos, Brasil) foi ativada em caldo MRS (1%) por 12 horas e a partir daí, foi feita a curva de crescimento do microrganismo a 37°C. Durante 24 horas, foi retirada uma alíquota desse caldo por hora e foi realizado o plaqueamento em profundidade, em ágar MRS e a incubação foi feita a 37°C por 72 horas, em microaerofilia.

Com os resultados da curva de crescimento do *Lactobacillus acidophilus* La5 (Figura 1) observou-se que o tempo ideal para o cultivo a 37°C é de 15 horas, onde o microrganismo apresenta-se no final da fase estacionária. Por isso, a partir desses resultados foi adotado o tempo de 15 horas de incubação a 37°C para o cultivo do *L. acidophilus* em caldo MRS.

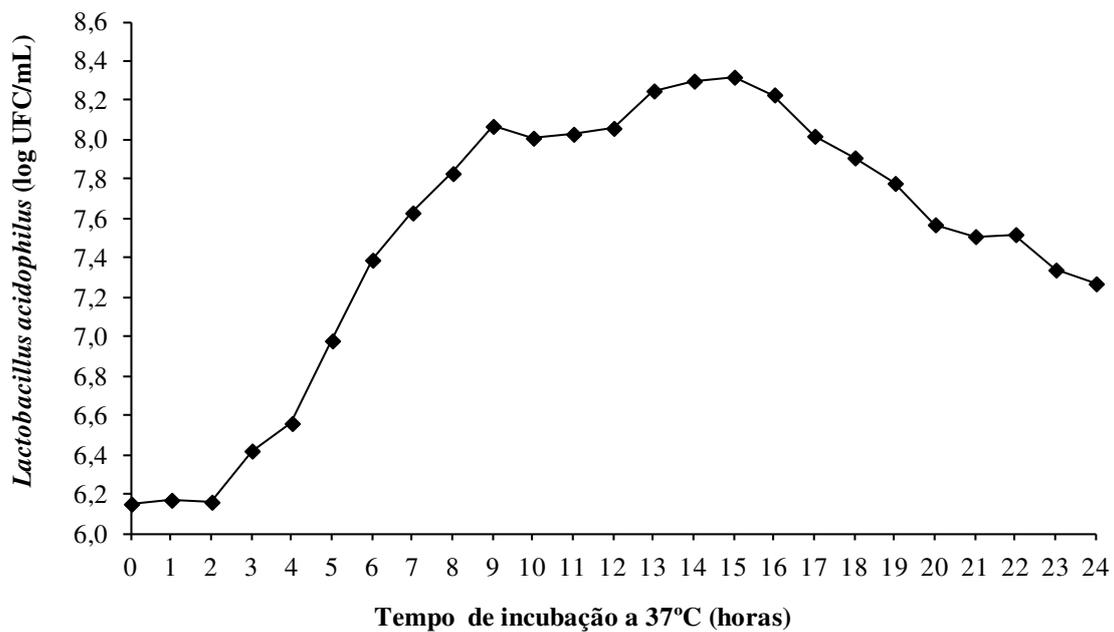


Figura 1 – Viabilidade (log₁₀ UFC/mL) do *Lactobacillus acidophilus* La5 durante 24 horas de incubação em caldo MRS a 37°C.

ANEXO 2

Análise estatística de regressão – solubilidade proteica x viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* em microcápsulas recobertas com proteína de soro

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,712898619
R-Quadrado	0,508224442
R-quadrado ajustado	0,459046886
Erro padrão	1,59674789
Observações	12

<i>ANOVA</i>	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	26,34883	26,34883	10,33448	0,009258
Resíduo	10	25,49604	2,549604		
Total	11	51,84487			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	6,846881881	0,711775	9,619442	2,27E-06	5,260948	8,432816
Solubilidade	-0,062550697	0,019458	-3,21473	0,009258	-0,1059	-0,0192