



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – PPGCTA

JOSE HONÓRIO PEREIRA LOPES NETO

DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO TIPO REINO ADICIONADO
DE *Lb. acidophilus* (LA-3) MICROENCAPSULADO

JOÃO PESSOA – PB

2018

JOSÉ HONÓRIO PEREIRA LOPES NETO

DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO TIPO REINO ADICIONADO
DE *Lb. acidophilus* (LA-3) MICROENCAPSULADO

JOÃO PESSOA – PB

2018

JOSÉ HONÓRIO PEREIRA LOPES NETO

DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO TIPO REINO ADICIONADO
DE *Lb. acidophilus* (LA-3) MICROENCAPSULADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Haíssa Roberta Cardarelli

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Luiza Mattos Braga

JOÃO PESSOA – PB

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L864d Lopes Neto, José Honorio Pereira.

Desenvolvimento de queijo tipo Reino adicionado de *Lb. acidophilus* (LA-3) microencapsulado / José Honorio Pereira Lopes Neto. - João Pessoa, 2018.

95 f. : il.

Orientação: Haíssa Roberta Cardarelli.

Coorientação: Ana Luiza Mattos Braga.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT.

1. Laticínios. 2. Probióticos. 3. Potencial Funcional.
4. Textura. 5. Gelificação Iônica. I. Cardarelli,
Haíssa Roberta. II. Braga, Ana Luiza Mattos. III.
Título.

UFPB/BC

JOSÉ HONÓRIO PEREIRA LOPES NETO

DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO TIPO REINO ADICIONADO DE *Lb. acidophilus*
(LA-3) MICROENCAPSULADO

Dissertação _____ em ____/____/2018.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Graciele da Silva Campelo Borges – PPGCTA/CT/UFPB
Coordenador da Banca Examinadora



Prof. Dr. Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro – PPGCTA/CT/UFPB
Examinador Interno



Prof. Dr. Maria Lúcia Conceição – CCS/UFPB
Examinador Externo

**A Deus,
Dedico.**

Agradecimentos

A DEUS, pela dádiva da vida e por estar sempre ao meu lado nas dificuldades, angústias, conquistas e felicidades;

Aos meus PAIS, meus exemplos de seres humanos, pela ajuda nas dificuldades, pelos conselhos diante das indecisões, pelas comemorações frente a cada vitória e acima de tudo, pelo eterno amor;

A minha noiva, Kerolayne Santos, pelo amor em todos os momentos, pela paciência nos meus momentos de desespero, pela espera nos momentos da minha ausência, pelo apoio e companheirismo durante todos esses anos, bem como as ajudas acadêmicas imensuráveis;

A Professora Dr.^a Haíssa Roberta Cardarelli, pela orientação nessa pesquisa, pela amizade e magníficos ensinamentos, dos quais certamente nunca esquecerei;

A minha Co-orientadora Dr.^a Ana Luiza Mattos Braga, pela paciência e ricos ensinamentos e a aposta no propósito do projeto;

A todos os professores envolvidos direto e indiretamente nesta pesquisa, pela contribuição de alguma forma e pelo carinho. Porque o trabalho dos professores não se limita à sala de aula. Os professores cuidam e se preocupam como pais, porque são eles que preparam e orientam as gerações futuras.

Aos meus amigos Thiago Henrique, Pedro Anderson, Victor Anibal, pelas horas de descontração e constantes incentivos;

Aos amigos conquistados ao início desta jornada: Camila Veríssimo, Maria Isabel, Thaise Cavalcante, entre outros, que contribuíram nas etapas mais difíceis de forma direta e esplêndida para este momento;

A Liliane Andrade pela amizade e apoio desde início, pelos momentos áridos de estudo, discussões, mas também de descontração e amparo. Sou eternamente agradecido pela sua amizade e seus preceitos;

Ao meu grupo de pesquisa: Emmanuel Souza, Marília Santos, Rafaela Felix, Mayara Costa pela contribuição inestimável;

Aos técnicos Patrícia Almeida, Larissa, José Carlos, Aline Souza, Gisleânea Dourado e Mércia Galvão pelo apoio laboratorial prestado a mim, no momento essencial da pesquisa;

Ao técnico João Bosco pelo apoio e suporte a minha pesquisa na situação crucial em que me encontrava;

A coordenação de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos;

A Universidade Federal da Paraíba e ao Centro Tecnológico de Desenvolvimento Regional pelo suporte prestado;

Ao órgão de fomento CAPES pela concessão da bolsa de estudos do mestrado;

A todos meus amigos e colegas que de alguma forma contribuíram para a execução desta pesquisa.

Meu muito Obrigado!

“A person who never made a mistake, never tried anything new”

Albert Einstein

RESUMO

Queijos como o tipo Reino podem ser excelentes veículos para culturas probióticas. A microencapsulação de probióticos confere proteção adicional ao micro-organismo, facilitando sua sobrevivência no queijo, bem como exerce função de barreira, não permitindo a interação com componentes do queijo, a fim de não o descaracterizar. A adição de substâncias, como hidróclorato de L-cisteína e ácido ascórbico, associada com biopolímeros na microencapsulação pode favorecer a manutenção da viabilidade do probiótico nas micropartículas. Esta pesquisa teve como principal objetivo desenvolver formulações de queijo tipo Reino contendo ou não o probiótico *Lb. acidophilus* livre ou microencapsulado a fim de obter um produto com potencial funcional. Micropartículas de *Lb. acidophilus* foram desenvolvidas utilizando a tecnologia de gelificação iônica com alginato de sódio aditivada de hidróclorato de L-cisteína e/ou ácido ascórbico, a fim de favorecer a sobrevivência das bactérias lácticas adicionadas. As micropartículas foram caracterizadas quanto a morfologia; distribuição; tamanho; além do monitoramento da viabilidade probiótica ao longo da vida de prateleira (60 dias). Três formulações de queijo foram desenvolvidas, uma sem adição de *Lb. acidophilus* (T1 - controle), outras contendo o probiótico livre (T2) ou presente via micropartículas (T3). Os queijos foram analisados logo após fabricação e após 25 dias de maturação, quanto aos parâmetros microbiológicos de controle de qualidade e porcentual de sobrevivência dos *Lactobacillus* spp. Os parâmetros físico-químicos analisados nas formulações dos queijos foram pH, acidez titulável, atividade de água, teor de lipídios, teor de proteínas, umidade, cinzas, índices de extensão e de profundidade da proteólise e perfil de textura. Micropartículas apresentaram diâmetro médio de $58 \pm 1,51 \mu\text{m}$, forma esférica, lisa e uniforme. O queijo adicionado de *Lb. acidophilus* na forma livre (T2) apresentou viabilidade de lactobacilos totais menor ($7,3 \pm 0,05 \text{ Log UFC/ g}$) comparada com o controle ($7,9 \pm 0,03 \text{ Log UFC/ g}$) após o período maturação. Entretanto, a formulação adicionada das micropartículas apresentou viabilidade acima de 8 Log UFC/g. Diferenças significativas ($p < 0,05$) nos parâmetros de pH, acidez, proteínas, umidade, cinzas e extrato seco total foram observadas em T2 e T3 quando comparadas com o queijo controle (T1). O queijo controle apresentou maiores valores para a maioria dos parâmetros de textura em comparação aos queijos adicionados com probióticos. Além disso, observa-se o efeito positivo deste aspecto para queijos Reino adicionados de probióticos, devido à diminuição significativa na dureza e mastigabilidade durante a maturação. Além disso, o queijo adicionado de micropartículas (T3) tornou-se viável, uma vez que proporcionou proteção adicional ao micro-organismo *Lb. acidophilus*, beneficiando a sobrevivência celular microbiana, com melhoria das características da textura, e, portanto, resultando num queijo Reino com potencial funcional.

Palavras-chave: Laticínios, probiótico, potencial funcional, textura, gelificação iônica.

ABSTRACT

Cheeses like Reino type can be excellent vehicles for probiotic cultures. The microencapsulation of probiotics confers additional protection to the microorganism, facilitating its survival in cheese, as well as exerts a barrier function, not allowing the interaction with cheese components, in order not to mischaracterize it. The addition of substances, such as L-cysteine hydrochloride and ascorbic acid, associated with biopolymers in microencapsulation, may favor the maintenance of probiotic viability in the microparticles. This research had as main goal the development of formulations of Reino cheese containing or not the probiotic free or microencapsulated *Lb. acidophilus* in order to obtain a product with functional potential. Microparticles of *Lb. acidophilus* were developed using ionic gelation technology with sodium alginate added by L-cysteine hydrochloride and/or ascorbic acid in order to promote the survival of the added lactic acid bacteria. Microparticles were characterized according of morphology; distribution and size of the microparticles and shelf life monitoring (60 days). Three cheese formulations were developed, one without addition of *Lb. acidophilus* (T1 - control), others containing free probiotic (T2) or present one via microparticles (T3). The cheeses were analyzed immediately after manufacture and after 25 days of maturation, regarding the microbiological parameters of quality control and the survival percentage of *Lactobacillus* spp. The physical-chemical parameters analyzed in the cheese formulations were pH, titratable acidity, Aw, fat content, protein content, moisture, ash, indices of extent and depth of proteolysis and texture profile. Microparticles had a mean diameter of $58 \pm 1.51 \mu\text{m}$, spherical, smooth and uniform shape. The added cheese of *Lb. acidophilus* in the free form (T2) presented viability of total lactobacilli lower ($7.3 \pm 0.05 \text{ Log CFU/ g}$) compared to the control ($7.9 \pm 0.03 \text{ Log CFU/ g}$) after the maturation period. However, the added formulation of the microparticles presented above 8 Log CFU/ g, evidencing maintenance of the microorganism. Significant differences ($p < 0.05$) in pH, acidity, protein, moisture, ash and total dry matter parameters were observed when compared to control (T1). The control cheese presented higher values for most of the texture parameters compared to the cheeses added with probiotics. In addition, the positive effect in this aspect for Reino cheeses added of probiotics is observed, due to the significant decrease in hardness and chewiness during maturation. In addition, the added cheese of microparticles (T3) has become viable, since it provides additional protection to the microorganism *Lb. acidophilus* benefiting microbial cell survival, with an improvement in texture characteristics and, therefore, resulting in a potential functional Reino cheese.

Keywords: Dairy products, probiotic, functional potential, texture, ionic gelation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma de processamento do queijo tipo Reino adicionado de <i>Lb. acidophilus</i> livre ou microencapsulado.....	37
----------	--	----

ARTIGO 1

Figure 1	Reino cheese Texture Profile Analysis Graph (N/ s). H (Hardness); A ₁ (área 1); A ₂ (área 2); A ₃ (área 3); t ₁ (tempo 1); t ₂ (tempo 2).....	50
----------	--	----

ARTIGO 2

Figura 1	Porcentual de sobrevivência de <i>Lb. acidophilus</i> (LA-3) nas diferentes formulações de micropartículas mantidas sob refrigeração (4 ± 2 °C) ao longo de 60 dias. F1 (Alginato puro); F2 (Alginato + L-Cisteína); F3 (Alginato + Ác. Ascórbico); F4 (Alginato + L-Cisteína + Ác. Ascórbico).....	68
Figura 2	Microscopia óptica das micropartículas atomizadas via <i>spray dryer</i> (F3: Alginato + probiótico + Ác. Ascórbico). Setas vermelhas indicam as partículas produzidas.....	69
Figura 3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das micropartículas da formulação F3: Alginato + probiótico + Ác. Ascórbico. (A) Aumento de 5000 vezes. Setas vermelhas indicam o microrganismo; (B) Aumento de 1500 vezes. Setas vermelhas indicam as partículas produzidas.....	70
Figura 4	Histograma de distribuição de partículas da formulação F3: Alginato + probiótico + Ác. Ascórbico).....	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Produtos adicionados de cepas probióticas.....	20
Quadro 2	Avaliação da sobrevivência de probióticos em queijos maturados durante o período de armazenamento.....	21
Quadro 3	Levantamento das condições gastrointestinais de modelos simulados em queijos.....	22
Quadro 4	Classificação dos queijos quanto a umidade e gordura no extrato seco (GES).....	23
Quadro 5	Levantamento das propriedades físico-químicas para queijo tipo Reino.....	24
Quadro 6	Principais técnicas utilizadas para microencapsular culturas probióticas.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Formulações das micropartículas produzidas.....	32
----------	---	----

ARTIGO 1

Table 1	Physicochemical analyses of pH, acidity, water activity, moisture, total dry extract, ashes, fats, proteins, extent and depth proteolysis indexes (EPI and DPI) of Reino cheeses before (time 1 day) and after maturation (time 25 days) (mean \pm standard deviation) (n = 3).....	47
Table 2	Values of the texture parameters of Reino cheese with or without the addition of <i>Lb. acidophilus</i>	51

ARTIGO 2

Tabela 1	Contagem de <i>Lactobacillus</i> spp. após 1 dia, 25 dias de maturação e na porção recomendada (30 g) de queijo tipo Reino.	72
----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Lb</i>	<i>Lactobacillus</i>	19
°C	Graus Celsius	20
UFC	Unidades Formadoras de Colônia	20
TGI	Trato Gastrointestinal	21
UFC/g	Unidades Formadoras de Colônia por grama	22
U	Umidade	24
Gd	Gordura	26
EST	Extrato Seco Total	26
NaCl	Cloreto de Sódio	26
TGI	Trato gastrointestinal	23
FAO	Food and Agriculture Organization	23
WHO	World Health Organization	23
min	Minuto	23
CMC	Carboximetilcelulose	27
µm	Micrômetros	30
ATP	Trifosfato de Adenosina	31
LPCP	Laboratório de Processamento de Carnes e Pescados	32
CTDR	Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional	32
LSR	Laboratório de Solidificação Rápida	32
LAQA	Laboratório de Análises Químicas de Alimentos	32
DTA	Departamento de Tecnologia de Alimentos	32
COAPECAL	Cooperativa Agropecuária do Cariri	32
LH-B02	<i>Lactobacillus helveticus</i>	32
R-704	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	32
LA-3	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	32
Chr.	Christian Hansen	32
P.A	Para análise	32
p	peso	33
v	Volume	33
Ác.	Ácido	33
Log	Logaritmo	33

MRS	deMan, Rogosa e Sharpe	34
RPM	Rotação Por Minuto	34
PVDF	Fluoreto Polivinilideno	34
CaCl ₂	Cloreto de cálcio	32
cm	Centímetro	35
mL	Mililitros	34
EM	Eficiência da Microencapsulação	35
L	Litros	35
g	Gramas	35
MO	Microscopia óptica	36
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura	36
mm	Milímetro	36
kV	Quilovolt	37
Kg	Quilograma	39
NMP	Número Mais Provável	39
h	Hora	40
NaOH	Hidróxido de sódio	40
ANOVA	Análise de Variância	42
Aw	Atividade de água	50
IEP	Índice de Extensão da Proteólise	50
IPP	Índice de Profundidade da Proteólise	50

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Micro	30
α	Alfa	23
®	Marca registrada	23
<	Menor	25
>	Maior	25
κ	Káppa	30
β	Beta	30
\pm	Mais ou menos	33
%	Porcentagem	34
x	Veze	35
=	Igual	35
Å	Angstrom	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1.	POTENCIAL PROBIÓTICO.....	19
2.2.	RESISTÊNCIA SIMULADA <i>IN VITRO</i> DO PROBIÓTICO INCORPORADO EM PRODUTOS LÁCTEOS.....	22
2.3.	QUEIJO TIPO REINO.....	23
2.4.	MICROENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS.....	25
2.4.1.	Gelificação iônica.....	28
2.4.2.	Adição de ingredientes coadjuvantes à micropartícula.....	29
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1.	LOCAL DA PESQUISA.....	31
3.2.	MATERIA-PRIMA, REAGENTES E CULTURAS.....	31
3.3.	MICROENCAPSULAÇÃO.....	32
3.3.1.	Delineamento experimental.....	32
3.3.2.	Reativação de <i>Lb. acidophilus</i>.....	32
3.3.3.	Preparo das soluções e reagentes.....	33
3.3.4.	Gelificação iônica.....	33
3.3.5.	Eficiência da microencapsulação.....	34
3.3.6.	Enumeração de <i>Lb. acidophilus</i> para micropartículas e queijos fabricados... 34	34
3.3.7.	Caracterização morfológica das micropartículas por microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	35
3.3.8.	Análise de tamanho e distribuição de micropartículas.....	35
3.4.	PROCESSAMENTO DO QUEIJO TIPO REINO.....	35
3.5.	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS DA MATÉRIA-PRIMA E DAS FORMULAÇÕES DE QUEIJO TIPO REINO.....	37
3.5.1.	Análises microbiológicas.....	37
3.5.2.	Análises físico-químicas.....	38
3.6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1.	ARTIGO 1.....	40
4.2.	ARTIGO 2.....	56
5	CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO.....	80
	REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

Alimentos funcionais são compostos de substâncias bioativas, que tem a capacidade de atuar benéficamente nos organismos, além de entregar o efeito nutricional adequado, contribuindo para redução de risco de doença (ILSI EUROPE, 1999). São exemplos de produtos funcionais os probióticos, carotenoides, flavonoides, ácidos graxos e fibras (MARTIROYSAN; SINGH, 2015).

Os probióticos são geralmente adicionados em produtos lácteos (LIMA et al., 2014), cujo mercado continua em ascensão mundial, devido aos produtos inovadores com características funcionais introduzidos neste segmento (BIGLIARDI; GALATI, 2013). As culturas probióticas mais empregadas são bactérias lácticas e pertencem aos gêneros *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. (TRIPATHI; GIRI, 2014). De acordo com Karimi; Mortazavian; Da Cruz (2011), queijos são importantes veículos para as culturas probióticas, devido ao alto teor de proteínas e gorduras, favorecendo a estabilidade da cultura durante o armazenamento e consumo do mesmo. Vale destacar que culturas lácticas iniciadoras utilizadas para fabricação de queijo tipo Reino, como *Lactobacillus helveticus* vem ganhando destaque pelo seu potencial funcional nos produtos que os contém (TAVERNITI; GUGLIELMETTI, 2012; LECLERC et al., 2002).

Algumas pesquisas envolvendo queijos com apelo funcional evidenciaram a possibilidade de incorporação de culturas probióticas naqueles que possuem características que naturalmente dificultam a sobrevivência das mesmas como os maturados, a exemplo de Cheddar (ZHANG et al., 2013), Edam (SABIKHI; KUMAR; MATHUR, 2013) e Prato (CICHOSKI et al., 2008; TENÓRIO, 2012). A funcionalidade desses queijos devido aos prováveis benefícios à saúde dos consumidores deve estar relacionada às condições de manutenção da viabilidade dos probióticos durante a vida de prateleira, sendo necessária a refrigeração como método de conservação (ALBENZIO et al., 2013). Porém não há estudos para aplicação de micro-organismos com potencial probiótico em queijo tipo Reino. Considera-se, assim, que é fundamental desenvolver pesquisas com outros tipos de queijo e de culturas probióticas, visto que os resultados de viabilidade podem sofrer influências variadas e comprometer a aplicação comercial.

Segundo Furtado (2008), o queijo tipo Reino, tradicionalmente brasileiro, pouco se assemelha com o queijo Edam, proveniente da Holanda. Suas características como aroma, coloração e sabor são mais intensos, além de possuir poucas olhaduras e maior firmeza. A comercialização é feita em embalagens em alumínio, que em conjunto com a maturação,

agrega valor ao produto. O autor ainda afirma que o queijo tipo Reino se encontra inserido na classe dos queijos finos, é consumido com maior intensidade em determinadas épocas do ano, contudo com o aumento da demanda, a indústria de laticínios passou a produzi-lo continuamente.

Para inserção de probióticos em queijos maturados, como tipo Reino, faz-se necessário a utilização de tecnologias, como a microencapsulação, a fim de melhorar sua viabilidade durante o processamento e armazenamento e contribuir para a estabilidade durante a exposição às condições gastrointestinais, nas quais baixos valores de pH e presença de sais biliares dificultam a sobrevivência dessas culturas (SABIKHI; KUMAR; MATHUR, 2014).

A microencapsulação é um processo de aprisionamento de uma determinada substância, como exemplo, os compostos bioativos, por biopolímeros como o alginato, originando micropartículas de tamanhos diferenciados (ZUIDAM; SHIMONI, 2010). Além disso, Burgain et al. (2011) afirmam que ao aplicar essa tecnologia, pode-se controlar a liberação das cepas, uma vez que é indispensável que estes atinjam o local de ação específico para que possam garantir os benefícios à saúde dos consumidores. Além da manutenção da viabilidade e controle da liberação da bactéria, a microencapsulação tem função de barreira para o micro-organismo frente as condições intrínsecas da matriz, a fim de não a descaracterizar, uma vez que, se adicionado na forma livre, este pode alterar as características do produto final (GARCÍA-CEJA et al., 2015; SILVA, et al., 2018).

Estudos relatam que a utilização de substâncias, como ácido ascórbico e hidrocloreto de L-cisteína, alteram o potencial redox do meio no qual o micro-organismo está inserido, favorecendo sua manutenção devido principalmente à diminuição de oxigênio presente (DAVE; SHAH, 1997 a, b; KIM et al., 1993; SHISHATA; SHAH, 1999). A partir dessa premissa, a incorporação de ácido ascórbico e hidrocloreto de L-cisteína em micropartículas adicionadas do probiótico *Lb. acidophilus* torna-se uma alternativa para manutenção da sobrevivência do micro-organismo.

Nesse contexto, os queijos maturados como o tipo Reino podem ser funcionais pela adição de outras bactérias lácticas como o *Lb. acidophilus*, mantendo suas características, apresentando-se como alternativa para a comercialização de alimentos potencialmente funcionais. Assim, esta pesquisa teve como objetivo desenvolver formulações de queijo tipo Reino contendo ou não o probiótico *Lactobacillus acidophilus* livre ou microencapsulado a fim de obter um produto com potencial funcional.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 POTENCIAL PROBIÓTICO

A definição de probióticos é entendida como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios a saúde do hospedeiro” (HILL et al., 2014). As melhorias à saúde humana que os probióticos tem a capacidade de fornecer abrangem efeitos como regulação do sistema gastrointestinal, controle do colesterol, auxílio na imunidade, nas alergias e nas infecções que comprometem o sistema respiratório, efeitos anticancerígenas, anti-hipertensivo, entre vários outros (GARCIA-RUIZ et al., 2014; RIBEIRO et al., 2014). Os gêneros comumente associados a produtos probióticos são *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (TRIPATHI; GIRI, 2014).

As bactérias lácticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus* são bacilos, Gram-positivos, que apresentam ótima multiplicação em temperatura 35 – 40 °C, em pH em torno da neutralidade (5,5-6,0), algumas cepas tendo a capacidade de sobreviver a ambientes ácidos, na presença ou ausência de oxigênio, podendo apresentar caráter homo ou heterofementativo (GOMES; MALCATA, 1999; PADILHA, 2013; ANJUM et al., 2014).

A legislação brasileira considera como micro-organismos probióticos aqueles que podem ser adicionados aos alimentos e que trazem benefícios ao organismo, não estabelecendo quantidade mínima viável da cultura nos alimentos a serem considerados probióticos. Entretanto seu uso requer comprovação com relação a segurança e benefícios à saúde (BRASIL, 2018).

A incorporação de probióticos em produtos lácteos está amplamente disseminada na literatura conforme explicitado no Quadro 1. A viabilidade do probiótico, segundo Antunes et al. (2012), está diretamente relacionada à interação das espécies presentes no alimento. Shah (2007); Vesterlund; Salminen; Salminen (2012) afirmaram que o obstáculo para manutenção da viabilidade desejada está na combinação adequada do probiótico com a matriz alimentar na qual será inserido. Isto inclui propriedades do próprio alimento bem como relacionadas ao ambiente, como teor de gordura, concentração de sal, pH, disponibilidade de oxigênio, presença de outros micro-organismos, proteínas e açúcares.

Quadro 1 – Produtos adicionados de cepas probióticas.

Produtos	Cepas utilizadas	Fontes
Bebidas lácteas fermentadas	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12; <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5, <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 e <i>Streptococcus thermophilus</i> ;	ANTUNES et al., 2012; SILVEIRA et al., 2014; GARCIA, 2011;
Iogurtes	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium pseudolongum</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i>	MAZOCHI et al., 2010
Queijo Cheddar	<i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> e <i>Bifidobacterium</i> spp.	GARDINER et al., 1998; ONG; HENRIKSSON; SHAH, 2006; ONG; HENRIKSSON; SHAH, 2007a; ONG; HENRIKSSON; SHAH, 2007b;
Queijo Coalho	<i>Lactobacillus acidophilus</i> DVS (Christian Hansen); <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5; <i>Lactobacillus paracasei</i> (L. casei-01) e <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12; <i>Lactobacillus casei</i> (Coleção de culturas UFPE); <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> e <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	SANTOS et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2012; GARCIA et al., 2012; LIMA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014; BEZERRA, 2015
Queijo prato	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (Rhodia); <i>Lactobacillus acidophilus</i>	CICHOSKI et al., 2008; TENORIO, 2012
Queijo Minas Frescal	<i>Lactobacillus paracasei</i> (Lbc 82, Rhodia); <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	BURITI et al., 2005a; BURITI et al., 2005b
Queijo tipo Petit-suisse	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BL-04 e <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5;	PEREIRA, 2007; CARDARELLI et al., 2007
Ricota Cremosa	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	FRITZEN-FREIRE et al., 2013
Ricota	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 e <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	MEIRA, 2015

Fonte: Adaptado de Meira (2015).

Os queijos são considerados ambiente adequado para os probióticos devido a sua consistência e capacidade tamponante. A predisposição em manter o pH estável é favorável à promoção de um sistema anaeróbio originado a partir da densidade proteica do alimento e alto teor lipídico, podendo oferecer maior proteção às células dos micro-organismos probióticos (MIRZAEI; POURJAFAR; HOMAYOUNI, 2012; CRUZ et al., 2009; HAYES et al., 2006),

consequentemente ajudando na manutenção da viabilidade durante a vida de prateleira do produto e a passagem através do sistema gastrointestinal (COMAN et al., 2012).

Cepas probióticas incorporadas aos queijos são capazes de influenciar na bioquímica do produto porque podem modificar as frações lipídicas e proteicas no queijo durante a maturação. Tais transformações têm um efeito sobre os parâmetros sensoriais dos queijos. Sua funcionalidade à saúde dos consumidores está relacionada às condições de manutenção da viabilidade ainda no queijo durante a vida de prateleira, necessitando do auxílio de métodos de conservação como a refrigeração (ALBENZIO et al., 2013).

A utilização de culturas probióticas em queijos tem sido bastante estudada (ZHANG et al., 2013; ABADÍA-GARCÍA et al., 2013; PINTINO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012). Entretanto, em âmbito nacional ainda há pouca comercialização de queijos potencialmente probióticos e, portanto, há potencial de expansão das pesquisas, inclusive com desenvolvimento de queijos maturados, pois estudos evidenciam a possibilidade de incorporação de probióticos em vários tipos de queijos com tempo de maturação considerável como Cheddar e Edam (MCBREARTY et al., 2001; SABIKHI; KUMAR; MATHUR, 2013). Alguns estudos com queijos maturados podem ser observados no Quadro 2.

Quadro 2 – Avaliação da sobrevivência de probióticos em queijos maturados durante o período de armazenamento.

Tipo de queijo	Cepa avaliada	Período avaliado (dias)	Viabilidade final (UFC/g)	Fontes
Queijo prato	<i>Lb. rhamnosus</i>	90	10 ⁸	CICHOSKI et al., 2008
Cheddar	<i>Lb. plantarum</i> K25	84	10 ⁹	ZHANG et al., 2013
Queijo maturado	<i>Lb. rhamnosus</i> GG e <i>Lb. bulgaricus</i> 2772	28	10 ⁷	GONZÁLEZ-OLIVARES et al., 2014
Queijo prato	<i>Lb. acidophilus</i> LA-5	60	10 ⁵	TENÓRIO, 2012

Fonte: Adaptado de Rolim (2015).

2.2 RESISTÊNCIA SIMULADA *IN VITRO* DO PROBIÓTICO INCORPORADO EM PRODUTOS LÁCTEOS

A viabilidade da bactéria probiótica deve ser mantida durante a passagem pelo sistema gastrointestinal (TGI) dos consumidores. Estudos da resistência probiótica simulada *in vitro* permitem essa avaliação, bem como a compreensão dos mecanismos de atuação de cepas probióticas funcionais. Esses tipos de testes foram preconizados pela Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO, 2002). Os modelos *in vitro* de simulação da digestão fornecem uma resposta seletiva e em curto tempo com relação aos produtos alimentares (COLES; MOUGHAN; DARRAGH, 2005). A sua utilização em alimentos inovadores, com o objetivo de testar a sua eficácia, é totalmente dependente dos modelos disponíveis que sejam capazes de simular com rigor as interações físico-químicas e fisiológicas que acontecem no TGI humano (ROLIM, 2015).

O Quadro 3 apresenta alguns estudos com simulação da resistência probiótica *in vitro* de queijos probióticos compilados por Rolim (2015).

Quadro 3 – Levantamento das condições gastrointestinais de modelos simulados em queijos.

Tipo de queijo	Cepa avaliada	Modelo simulado	Estudo
Queijo de soro de leite	<i>Lb. casei</i> LAFTI®L26, <i>Lb. acidophilus</i> LAFTI®L10 ou <i>B. animalis</i> Bo	α – amilase por 2 min; pepsina por 60 min; sais biliares e pancreatina por 60 min	MADUREIRA et al., 2011
Coalho	<i>Lb. acidophilus</i> ; <i>Lb. paracasei</i> ; <i>B. lactis</i>	α – amilase por 2 min; pepsina por 60 min; sais biliares e pancreatina por 60 min	OLIVEIRA et al., 2014
Cottage	<i>Lb. casei</i> ; <i>Lb. ramosus</i> GG	pepsina por 180 min; pancreatina e sais de bile e por 240 min	ABADÍA-GARCÍA et al., 2013
Pasta filata	<i>Lb. ramosus</i> (D44, F17, H12, H25, N24, R61)	Pepsina e lipase por 78 min; lecitina hepática, lipase pancreática, colipase, tripsina, quimiotripsina e α – amilase por 60 e 120 min	PINTINO et al., 2012

Fonte: Rolim (2015).

Parâmetros como o tempo de digestão e conteúdo de enzimas devem ser ajustados em relação à amostra a ser analisada pelos modelos *in vitro* (MCCLEMENTS; DECKER; PARK, 2009). Muitas vezes os estudos com simulação da digestão *in vitro*, não incluem a simulação da passagem através do intestino grosso, pois a maior absorção dos nutrientes processa-se no intestino delgado (BRANDON et al., 2006).

2.3 QUEIJO TIPO REINO

Os queijos podem ser classificados de acordo com umidade % (m/m) e gordura no extrato seco % (m/m), segundo a Instrução Normativa regulamentada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (Quadro 4) (BRASIL, 1996).

Os queijos ainda podem ser classificados de acordo com o grau de maturação em frescos ou maturados. Queijos frescos são aqueles consumíveis logo após sua fabricação. Já os maturados, necessitam serem acondicionados sob condições de umidade relativa e temperaturas controladas, para que haja as transformações bioquímicas que conferem características específicas para cada queijo (ABREU, 2005; CHALITA et al, 2009).

Quadro 4 – Classificação dos queijos quanto a umidade e gordura no extrato seco (GES).

Quantidade ao teor de umidade % (m/m)	% (m/m) Umidade
Baixa umidade	Até 35,9
Média umidade	36 – 45,9
Alta umidade	46 – 54,9
Muita alta umidade	≥ 55
Quanto ao teor de GES % (m/m)	% (m/m) GES
Extra gordo	> 60
Gordo	45 – 59,9
Semigordo	25 – 49,9
Magros	10 – 24,9
Desnatados	< 10

Fonte: Brasil (1996).

Furtado (2007) e Furtado (2008) afirmam que o queijo tipo Reino, inserido na categoria dos queijos finos, é considerado um queijo nacional originado a partir de queijos holandeses. Ainda segundo os autores, a denominação “Reino” foi influenciada pelo queijo holandês Edam,

o qual era exportado por meio do Reino de Portugal com destino ao Brasil. Apesar de ter sido originado a partir do Edam, o queijo tipo Reino apresenta-se mais seco, firme, picante, com coloração mais intensa, características estas que não são vistas no queijo holandês. Sua comercialização é feita em embalagens de alumínio em formado esférico, que em conjunto com a maturação, adquire maior valorização.

Inicialmente, seu consumo era limitado a algumas regiões do Brasil e em períodos específicos durante o ano. Contudo, diante da demanda, a indústria de laticínios intensificou a produção para disponibilização em todo território nacional e distribuídos durante todo o ano, visto que esse tipo de queijo foi o pioneiro na produção dos maturados em escala industrial (FURTADO, 2007; FURTADO, 2008). Outro fato importante analisado pelos autores, é que diferentes tecnologias de fabricações foram difundidas, inserindo ao comércio queijos com diferentes características de acordo com a demanda regional.

Pelo fato de o queijo tipo Reino ter sido contemplado com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade recentemente, a falta de padronização na sua fabricação ainda é um obstáculo. Além disso, poucos estudos foram publicados sobre queijo tipo Reino e suas propriedades físico-químicas conforme apresentado no Quadro 5 compilado por Taveira (2013).

Entende-se por queijo maturado como “aquele que sofreu as trocas bioquímicas e físicas necessárias e características da variedade do queijo” (BRASIL, 1996). Queijos maturados, como tipo Reino, são considerados produtos de alto valor comercial, além de maior importância na indústria queijeira nacional, devido às suas características sensoriais particulares, com destaque para o sabor, aroma e embalagem (GUIMARÃES et al., 2008).

Quadro 5 – Levantamento das propriedades físico-químicas para queijo tipo Reino.

U (%m/m)	Gd (%m/m)	EST (%m/m)	GES (%m/m)	pH	NaCl (%m/m)	Fontes
38-41	25-29	-	40-49	5,1-5,3	1,5-1,8	FURTADO; LOURENÇO NETO, 1999
36-40	25-30	60-64	40-51	5,1-5,3	1,5-1,8	FURTADO, 2007
33-36	30-33	64-67	47-50	5,70-5,78	1,0-1,2	FURTADO, 2008

Fonte: Taveira (2013); U (umidade); Gd (gordura); EST (extrato seco total); GES (gordura no extrato seco).

O principal obstáculo na fabricação de um queijo maturado probiótico, do tipo Reino, é garantir a viabilidade do probiótico durante o período de maturação e vida de prateleira. Alguns fatores como baixa atividade de água e de umidade proporcionam maior tempo de armazenamento, maior teor de sal e gordura, e podem influenciar na viabilidade das culturas probióticas ao longo do tempo. Logo, fica evidente que queijos maturados não oferecem as melhores condições para o desenvolvimento e manutenção da viabilidade das cepas probióticas (BURITI et al., 2005a).

2.4 MICROENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS

A viabilidade da cultura probiótica adicionada ao alimento depende da correta seleção da cepa probiótica, de sua concentração e identificação da etapa do processamento a ser adicionada, além das características do produto, como os aspectos físico-químicos, insumos, e matéria-prima e a interação entre as espécies microbianas presentes, produção de peróxido de hidrogênio, concentração de ácidos láctico e acético derivados do metabolismo bacteriano, e quantidade de oxigênio dissolvido (COMAN et al., 2012; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

As cepas probióticas devem ser capazes de manter sua viabilidade e estabilidade durante o processamento, armazenamento, bem como sobreviver às difíceis condições gastrointestinais do ser humano, para assim exercer o efeito benéfico proposto (KIM et al., 2008). A seleção das cepas probióticas envolve a sobrevivência ao ácido estomacal, resistência à bile e adaptação a condições adversas. Todavia, esses micro-organismos, na grande maioria, não são habilitados a preencher esses requisitos (LI et al., 2011; RAJAM et al., 2012). Em vista disso, diversos estudos salientam a baixa sobrevivência de células probióticas livres nos alimentos (DE VOS et al., 2010), indicando como necessária a busca por alternativas que aumentem a eficiência da sobrevivência dos probióticos a condições severas (KAILASAPATHY, 2009).

Assim, são propostas alternativas dentre as quais se destacam a introdução de micronutrientes (peptídeos e aminoácidos) e microencapsulação (FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008; BRINQUES; AYUB, 2011; CHAMPAGNE et al., 2011).

A microencapsulação é definida como uma tecnologia capaz de recobrir diversas micropartículas, gerando cápsulas de tamanho variado, as quais possuem a capacidade de liberação sob condições controladas ou específicas. Diversos são os benefícios dessa técnica, sendo importante destacar a aptidão em mascarar gosto de componentes amargos, aumentar a vida de prateleira, proteger contra fatores como luz, água e calor, controlar a liberação do

material, entre outras (FÁVARO-TINDADE; PINHO; ROCHA, 2008; MIRZAEI; POURJAFAR; HOMAYOUNI., 2012).

Segundo Zuidam; Shimoni (2010), a substância que é encapsulada é chamada de agente ativo ou fase interna. Já a substância que encapsula pode ser denominada de material de parede ou fase externa. Ainda afirma que o encapsulante (fase externa) deve formar uma barreira contendo o agente ativo (encapsulado). A metodologia “Retro-design”, na qual o desenvolvimento de um determinado produto encapsulado é decorrente de uma pré-análise da aplicação que ambiciona desenvolver com relação às características físico-químicas do produto, do mercado consumidor alvo, do benefício esperado ao consumidor, do processo de produção do alimento, pode ser utilizada para a escolha de uma determinada técnica de microencapsulação (BRAGA; UBBINK, 2012).

A Food Ingredients Brasil (2013) elenca dentre os materiais que podem ser encapsulados para aplicação na indústria alimentícia, ácidos, bases, óleos, vitaminas, sais, gases, aminoácidos, óleos essenciais, corantes, enzimas e micro-organismos, sendo que a maioria dessas substâncias são considerados compostos bioativos. Os materiais aplicados na encapsulação devem seguir alguns requisitos como: ter boas propriedades de formação de filme; baixa higroscopicidade; baixa viscosidade em altas concentrações de sólido; sabor e aroma suaves; ser de fácil reconstituição, baixo custo e ser semipermeável (ANAL; SING, 2007; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013).

Os estudos evidenciam que polímeros como alginato, quitosana, carboximetilcelulose (CMC), carragena, gelatina e pectinas são adequadas como materiais de parede, podendo variar de acordo com a técnica (FÁVARO-TINDADE; PINHO; ROCHA, 2008; LI et al., 2009; BUREY et al., 2009).

Existem inúmeras técnicas para a microencapsulação de probióticos, porém a escolha da técnica correta depende do conhecimento das variáveis imprescindíveis, como exemplo: (I) quais condições afetam a viabilidade do probiótico; (II) quais as condições do processo serão usadas no processamento do alimento; (III) quais serão as condições de estocagem do produto antes do uso pelo consumidor; (IV) qual o tamanho da micropartícula e densidade necessária para incorporá-la ao produto, e (V) qual o estímulo e o mecanismo de liberação (ZUIDAM; SHIMONI, 2010).

As distintas técnicas que vêm sendo aplicadas para a encapsulação de probióticos estão apresentadas no Quadro 6. Deve-se, também, levar em consideração que a sobrevivência do probiótico ao processo de microencapsulação afeta diretamente a viabilidade dessa cultura,

assim como o tipo e concentração do material de parede, tamanho das micropartículas, contagem inicial do micro-organismo e cepa utilizada (CHEN; CHEN, 2007).

Quadro 6 – Principais técnicas utilizadas para microencapsular culturas probióticas.

Técnica de microencapsulação	de Tipo de material encapsulante	Características principais do processo
<i>Spray-Drying</i>	Polímeros solúveis em água	Viabilidade de preparação de soluções com micro-organismos; atomização da solução que é nebulizada com produção de uma massa de gotículas; secagem do material nebulizador por evaporação; fácil separação do produto seco formado
Spray-congealing	Ácidos graxos, ceras polímeros solúveis e insolúveis em água, monômeros	Separação das soluções de revestimento da cápsula por congelamento, promovendo melhor agregação do material encapsulante e possibilidade de melhor remoção de solventes adjuntos.
Leito fluidizado	Polímeros solúveis e insolúveis em água, lipídeos, ceras	Preparação de soluções de revestimento com a fluidização de partículas nucleadas
Extrusão	Polímeros solúveis e insolúveis em água	Preparação de materiais de revestimento; dispersão de materiais e fácil agregação com o composto encapsulado; dispensa tratamento térmico; o que facilita a viabilidade do material termolábeis.
Técnica de separação de fases/ Coacervação	Polímeros solúveis em água	Processo que envolve a associação reversível de dois polímeros; possibilidade de se trabalhar com biopolímeros com ausência de solventes orgânicos e condições brandas de temperatura no processamento.
Método eletrostático	Composto ou polímeros com cargas opostas	Possibilita melhor interação dos materiais de revestimento com os materiais a serem encapsulados através da interação de cargas opostas.

Fonte: ANAL; SING (2007); SUNNY-ROBERTS; KNORR (2009).

Apesar da existência de várias técnicas de microencapsulação, em geral, há um mecanismo básico de três etapas para a encapsulação do que se deseja: (I) formação da parede em torno do material a ser encapsulado; (II) assegurar que um vazamento indesejado não ocorra;

(III) assegurar que os materiais indesejados não ultrapassem a parede (FANG; BHANDARI, 2010).

2.4.1 Gelificação iônica

A gelificação iônica é uma técnica bem comum tratando-se de microencapsulação de probióticos para geração de micropartículas de alginato de cálcio (PEDROSO et al., 2012; DE PRISCO et al., 2015; RIBEIRO et al. 2014). O método físico consiste na gelificação externa do alginato, o qual ocorre devido à adição do probiótico em uma solução de alginato de sódio, com finalidade de extrusão gota a gota, para uma solução de cloreto de cálcio (SMRDEL et al., 2008).

Racoviță et al. (2009) e Pasqualim et al. (2010) relatam que as micropartículas formadas devem permanecer em contato com a solução iônica por um período pré-determinado, a fim de alcançar estabilidade e resistência mecânica, uma vez que o fator tempo influencia diretamente na espessura da parede da cápsula, e, em consequência, na sua resistência à ruptura mecânica.

O princípio deste processo está baseado na interação do polissacarídeo com o polímero, pois em presença do cálcio o polissacarídeo pode trocar íon de sua estrutura por um íon divalente, gelificando o meio ao qual está inserido (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003). As micropartículas produzidas por esta técnica podem variar conforme o diâmetro de saída da solução, viscosidade, e concentração do alginato e a distância de gotejamento para a solução de cloreto de cálcio (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003). Estes autores ainda afirmam que não causa danos às células bacterianas, acarretando maior viabilidade quando comparado com as células sem a proteção.

Entretanto, Sauvant et al. (2012) ressaltam que as propriedades sensoriais não devem ser afetadas pelo produto contendo substâncias microencapsuladas. Assim, a determinação do tamanho das micropartículas é extremamente determinante com relação ao aspecto sensorial, devendo ser o menor possível a fim de evitar avaliação negativa, sendo o tamanho de até 100 μm desejável para adição em alimentos (HEIDEBACH; FORST; KULOZIK, 2009).

É relevante destacar que o método de gelificação iônica não utiliza solventes orgânicos, temperaturas elevadas, condições severas de pH, além disso utiliza-se de hidrogéis poliméricos naturais, tornando-se uma técnica propícia para a encapsulação de compostos bioativos (CHEW et al., 2015; WANG; WATERHOUSE; WATERHOUSE, 2013).

Portanto, percebe-se que as técnicas de microencapsulação, como gelificação, são promissoras (DA SILVA et al., 2015), porém ainda demonstram resultados controversos, uma vez que são dependentes de vários parâmetros.

2.4.2 Adição de ingredientes coadjuvantes à micropartícula

Os polissacarídeos regularmente utilizados na microencapsulação são originados de bactérias (goma gelana e xantana), de proteínas animais (leite e gelatina) ou de plantas (amido e seus derivados, κ -carragena e alginato) (RANTAMAKI; ROKKA, 2010). Menezes (2013) relata que o alginato é um material complexo formado por ligações $\beta - 1,4 - D -$ ácido maurônico e $\alpha - 1,4 - L -$ galurônicos, sendo permitido como aditivo alimentar e possuindo como característica principal a não toxicidade ao material encapsulado.

Estudos enfatizam a necessidade de combinação de substâncias como alginato adicionado de outros compostos a fim de atingir o objetivo principal, que é a manutenção da bactéria aprisionada, como exemplo, alginato associado ao óleo de palma (DING; SHAH, 2009), alginato e gelana, alginato e κ -carragena/goma alfarroba (TOTOSAUS; ARIZA-ORTEGA; PÉREZ-CHABELA, 2013). Outros ingredientes foram relatados como importantes influenciadores na viabilidade dos probióticos, como leite, nitrogênio não proteico, hidrolisado proteico de soro de leite, L-cisteína e alguns prebióticos (SAVINE et al., 2010; SARKAR, 2010).

Corroborando com o mencionado anteriormente, Santiesteban-lópez et al. (2013) afirmaram que fatores relacionados ao ambiente podem favorecer a viabilidade da cultura probiótica. Talwalkar; Kailasapathy (2004) salientam que peróxido de hidrogênio e acidez são parâmetros que podem afetar sua viabilidade em iogurtes, logo a diminuição no oxigênio torna-se fator determinante na sobrevivência celular.

Os mesmos autores ainda evidenciaram que alguns gêneros de bactérias como *Lactobacillus* spp. não possuem aptidão em sintetizar enzimas como citocromo, a qual é necessária para o transporte de elétrons, utilizando a cadeia fermentativa como alternativa para produção de energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP) (TALWALKAR; KAILASAPATHY, 2004).

O ponto central mencionado pelos autores Dave; Shah (1997 a, b); Shishata; Shah (1999); Kim et al. (2012) é que uma alteração, em níveis elevados, no potencial de oxirredução pode afetar diretamente a multiplicação celular de bactérias anaeróbias devido principalmente diminuição do oxigênio no meio. Produtos lácteos como os queijos possuem substâncias

intrínsecas que alteram o potencial de oxirredução, favorecendo assim a multiplicação de micro-organismos probióticos como exemplo da L-cisteína e ácido ascórbico, os quais podem agir em sinergia para alcançar tal função, conforme já relatado por Santiesteban-lópez et al. (2013).

Neste contexto, as indústrias de laticínios buscam, a cada dia, alternativas a fim de assegurar a viabilidade do micro-organismo com potencial probiótico no produto, sendo a microencapsulação uma possibilidade de garantir a chegada desses micro-organismos intactos ou em quantidade e viabilidade suficientes na região intestinal do hospedeiro em que podem atuar, possibilitando sua ação benéfica (AMIM et al., 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE PESQUISA

O processamento do queijo tipo Reino bem como as análises físico-químicas e microbiológicas de caracterização da matéria-prima e dos queijos foram realizadas no Laboratório de Processamento de Carnes e Pescado (LPCP), Laboratório de Análises Físico-Químicas e Laboratório de Microbiologia do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional (CTDR) – UFPB. As análises de microestrutura das micropartículas foram realizadas no Laboratório de Metais e Laboratório de Solidificação Rápida (LSR). Os experimentos para obtenção das micropartículas de *Lb. acidophilus* foram realizados no Laboratório de Análises Químicas de Alimentos (LAQA), localizados no Centro de Tecnologia, Campus I/UFPB, bem como no Laboratório de Processamento de Alimentos (DTA/CTDR).

3.2 MATÉRIA-PRIMA, REAGENTES E CULTURAS

O leite de vaca utilizado foi proveniente de mesma raça (Nelore), fase de lactação próxima e criada por sistema produtivo semi-intensivo, adquirido da Coapecal (Cooperativa Agropecuária do Cariri Ltda.), localizada na zona rural do município de Caturité, Paraíba, Brasil. O queijo tipo Reino foi fabricado utilizando culturas liofilizadas comerciais (Chr. Hansen, Valinhos, São Paulo, Brasil) “starter” *Lactobacillus helveticus* (LH-B02®) e mesofílicas homofermentativas tipo O (R-704®). As formulações contendo probiótico receberam adição da cultura *Lactobacillus acidophilus* (LA-3®) (Sacco, Campinas, São Paulo, Brasil). Além disso, corante de urucum (Rica Nata, Piracema, Minas Gerais, Brasil), cloreto de cálcio 40% (v/v) (Rica Nata, Piracema, Minas gerais, Brasil) e coagulante (Ha-la, Chr. Hansen, Valinhos, São Paulo, Brasil) foram utilizados. Os materiais utilizados para a encapsulação de *Lb. acidophilus* foram alginato de sódio (Ultrapan, Valinhos, São Paulo, Brasil), cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl₂) (Química moderna, Barueri, São Paulo, Brasil), citrato de sódio P.A (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), ácido ascórbico (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) e hidrocloreto de L-Cisteína (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil).

3.3 MICROENCAPSULAÇÃO

3.3.1 Delineamento experimental

A pesquisa foi desenvolvida através de experimentos que testaram os fatores ácido ascórbico e hidrocloreto de L-Cisteína, adicionados na proporção de 0,04% (p/v) na elaboração das micropartículas, para determinar a influência dessas variáveis na porcentagem de sobrevivência de *Lb. acidophilus* microencapsulado (Tabela 1). As formulações elaboradas foram F1 (Alginato puro); F2 (Alginato + L-Cisteína); F3 (Alginato + Ác. Ascórbico); F4 (Alginato + L-Cisteína + Ác. Ascórbico), preparadas aleatoriamente.

Tabela 1 - Formulações das micropartículas produzidas.

Formulações	Alginato de sódio 1,5% (v/v)	Probiótico (Log ₁₀)	Variáveis independentes	
			Ácido ascórbico (0,04%)	Hidrocloreto L- Cisteína (0,04%)
1	+	+	-	-
2	+	+	-	+
3	+	+	+	-
4	+	+	+	+

Fonte: Próprio autor.

As micropartículas produzidas foram armazenadas a 4 ± 2 °C para acompanhamento da viabilidade (Log UFC/g) durante 0, 20 e 30 e 60 dias. Após selecionar a formulação de micropartículas com maior porcentagem de sobrevivência, procedeu-se sua caracterização quanto a morfologia; distribuição e tamanho das micropartículas; e resistência às condições gastrointestinais *in vitro*. Finalmente, as micropartículas foram aplicadas na matriz alimentar, isto é, por incorporação em uma formulação de queijo tipo Reino. Todas as formulações foram realizadas em triplicata.

3.3.2 Reativação de *Lb. acidophilus*

O processo de reativação da cultura probiótica (*Lb. acidophilus*) mantida em glicerol foi adaptado de Gebara (2015); Silva (2016), conforme explicitado a seguir:

- Reativou-se a cultura mantida em glicerol em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS), transferindo-se 200 μ L para 5 mL de meio (Kasvi, São José dos Pinhais – PR) e incubando-se a 37 °C por 18 horas;
- Em seguida, transferiu-se, mantendo a mesma proporção, a cultura do primeiro repique para um tubo contendo volume maior de caldo MRS, e incubou-se sob as mesmas condições;
- Centrifugou-se a 6000 RPM (5934 x g) (Modelo: 5430R, Eppendorf, Hamburgo – Alemanha) a 20 °C por 5 minutos;
- Descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* com cerca de 14% (p/v) de água peptonada 0,1% (p/v).

3.3.3 Preparo das soluções de reagentes

Soluções-mães de alginato de sódio a 4% (p/v) e cloreto de sódio 4% (p/v) foram preparadas com água deionizada, mantidas sob agitação constante, posteriormente esterilizadas em autoclave a 121 °C. As soluções de ácido ascórbico (0,04% p/v) e hidrocloreto de L-cisteína (0,04% p/v) foram preparadas com vidrarias e água destilada estéreis, filtradas em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com diâmetro de 0,22 μ m (Bonna-Agela, Delaware, EUA). *Lb. acidophilus* foi adicionado diretamente na solução biopolimérica bem como as soluções dos ingredientes supracitados.

3.3.4 Gelificação iônica

Micropartículas de géis foram formadas a partir do gotejamento por extrusão das soluções biopoliméricas contendo o probiótico sobre uma solução aquosa de cloreto de cálcio (CaCl_2) a 4% (p/v) sob fraca agitação, que atuou como agente gelificante do biopolímero, conforme adaptação de Li et al. (2009); Silva et al. (2018). As soluções biopoliméricas foram gotejadas com auxílio de bomba peristáltica (*spray dryer*, modelo B-290 – Buchi, Valinhos, São Paulo, Brasil) com rotação de alimentação de 35 RPM e bico atomizador de um mini *spray dryer*, modelo B-290 (Buchi, Valinhos, São Paulo, Brasil). A altura entre a saída das gotas e o banho gelificante foi fixada em 20 cm de forma a obterem-se micropartículas esféricas. As micropartículas recém-formadas ficaram imersas na solução de CaCl_2 durante 30 min para completa gelificação. Após este período, as micropartículas foram coletadas por filtração

através de papel de filtro qualitativo 18 cm de diâmetro (Qualy, Fortaleza, Ceará, Brasil) e armazenadas sob refrigeração a 4 ± 2 °C para serem analisadas.

3.3.5 Eficiência da microencapsulação

A eficiência do processo de produção de micropartículas foi realizada a fim de conhecer a resistência da cepa de *Lb. acidophilus* ao processo de atomização, bem como ao de gelificação iônica. O micro-organismo foi enumerado na mistura biopolimérica antes e após atomização.

A eficiência da microencapsulação (EM) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Silva (2016) utilizando a Equação 1.

$$EM = \left(\frac{N}{N_0} \right) \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

N_0 é o número de células viáveis inicial (Log UFC/g) e N é o número de células viáveis nas micropartículas (Log UFC/g) após o processo de atomização e gelificação.

A enumeração microbiana na etapa da mistura biopolimérica foi realizada conforme descrito no item 3.3.6. Já a enumeração do probiótico na micropartícula foi realizada com 1 g de micropartículas que foi transferido para 10 mL de citrato de sódio (0,06 mol/ L) e submetido a agitação magnética (150 RPM) por 45 minutos a 37 °C em incubadora tipo *Shaker* com agitação orbital (Modelo Luca – 223, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil) para a liberação do micro-organismo da micropartícula. Seguiu-se, a partir de então, como descrito no item 3.3.6.

3.3.6 Enumeração de *Lb. acidophilus* para micropartículas e queijos fabricados

A enumeração de células viáveis de *Lb. acidophilus* foi realizada em profundidade, em ágar MRS, através de diluições decimais seriadas utilizando água peptonada 0,1% (p/v). Fez-se diluições até 10^{-13} para as micropartículas produzidas, já para os queijos até 10^{-10} . As placas foram incubadas a 37 °C por 72 horas em anaerobiose com auxílio de jarras de anaerobiose (Permutation, Curitiba – PR) (IDF, 1995).

3.3.7 Caracterização morfológica das micropartículas por microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após escolha da formulação de micropartículas a ser adicionada ao queijo tipo Reino, analisou-se a microestrutura das micropartículas úmidas através de microscópio óptico binocular com câmera digital acoplada (Quimis, Diadema, São Paulo, Brasil) com aumento de 1000 vezes, seguindo metodologia adaptada de Etchepare et al. (2016).

A morfologia das micropartículas também foi analisada com microscópio eletrônico de varredura com detector eletrosecundário, Modelo LEO 1430 (Zeiss, Goettingen, Alemanha) a uma tensão de aceleração de 10 kV com a finalidade de verificar a aparência externa das micropartículas. A determinação com MEV necessitou da liofilização das micropartículas e sua disposição em papel adesivo de carbono bem como a cobertura com ouro 200 Å (ångström). A distância de trabalho foi de 10 mm conforme adaptado de Lian et al. (2002); Castro-Cislaghi et al. (2012).

3.3.8 Análise de tamanho e distribuição de micropartículas

O tamanho e a distribuição das micropartículas úmidas da formulação escolhida foram medidos em uma unidade de amostragem através da difração a laser, modelo PSA 1090 (0,02 – 500 µm) (CILAS, Orleães, França). Água destilada foi utilizada como meio de suspensão e foi adicionada uma quantidade de amostra para produzir um obscurecimento suficiente de 3 a 7%, conforme sugerido pelo fabricante (SOUZA et al., 2012).

3.4 PROCESSAMENTO DO QUEIJO TIPO REINO

O delineamento experimental utilizado para fabricação dos queijos tipo Reino envolveu a elaboração de três formulações, sendo T1 denominada controle, pois continha apenas as culturas iniciadoras (0,26 g /10 L de leite), T2 e T3 contendo além das culturas iniciadoras, *Lb. acidophilus* (1% p/p) na forma livre e *Lb. acidophilus* encapsulado (1% p/p), respectivamente. O processamento do queijo tipo Reino seguiu metodologia sugerida por Furtado (2008), Taveira (2013) e Taveira et al. (2015) com modificações, conforme descrito resumidamente a seguir (Figura 1).

O leite bovino foi pasteurizado, recebeu corante de urucum (Rica Nata, Piracema, Minas Gerais, Brasil) (0,12 mL/ L de leite), as culturas “starter” e cloreto de cálcio 40% (v/v) (Rica Nata, Piracema, Minas Gerais, Brasil), respectivamente. Foi realizada a incubação a 32-34 °C/ 30 min. A formulação (T2) de queijo que continha *Lb. acidophilus* incorporado na forma livre incluiu a adição, na etapa de incubação, de 1% (p/p) de um inóculo de *Lb. acidophilus* obtido por concentração de células previamente reativadas conforme descrito em 3.3.2, a fim de atingir viabilidade aproximada de 10 Log UFC/ mL. O coagulante (Ha-Ia, Chr. Hansen, Valinhos, São Paulo, Brasil) foi então adicionado e a coagulação ocorreu (32-34 °C/ 30-35 min) seguida do corte da coalhada com auxílio de liras dispostas horizontal e verticalmente (grãos com 1,5 cm de aresta).

A primeira mexedura ocorreu de forma lenta por 12-15 minutos. A seguir removeu-se 30% (v/v) de soro em relação ao volume de leite, adicionou-se 20% (v/v) de água quente (40 °C) à coalhada, sob agitação contínua (correspondente à segunda mexedura), para aumentar a temperatura em 1 °C a cada dois minutos, até atingir a temperatura de 40-43 °C (aproximadamente 12 minutos). Logo após a coalhada foi dessorada (dessora total).

A formulação de queijo que continha *Lb. acidophilus* incorporado na forma de micropartículas (T3) teve a adição de 1% (m/m) das mesmas após dessorada total. A coalhada foi pré-prensada no tanque de fabricação por 20 minutos, então foi enformada e prensada em formas esféricas contendo cerca de 1 kg de coalhada, utilizando como carga o dobro do peso total na prensa por 20 horas. Após a desenformagem, os queijos foram salgados em salmoura a 20% (m/v) a 10-12 °C por 17 horas.

Os queijos foram desenformados após a salga, embalados a vácuo em embalagens plásticas, e colocados em câmara incubadora (Modelo EI: 08F1-H, Caltech, Recife, Pernambuco, Brasil) (12 ± 1 °C, 70% de umidade relativa do ar) por 10 dias, sendo virados diariamente. Os queijos foram então maturados por 15 dias em câmara (12 ± 1 °C, 55 – 65% de umidade relativa do ar) e, após este período, a embalagem foi retirada e a pintura foi realizada com corante natural de cochonilha (Docina Nutrição, Juiz de Fora – MG).

Os queijos foram mantidos sob refrigeração e analisados após um dia de fabricação e após 25 dias de maturação conforme descrito no item 3.5.1 e 3.5.2.

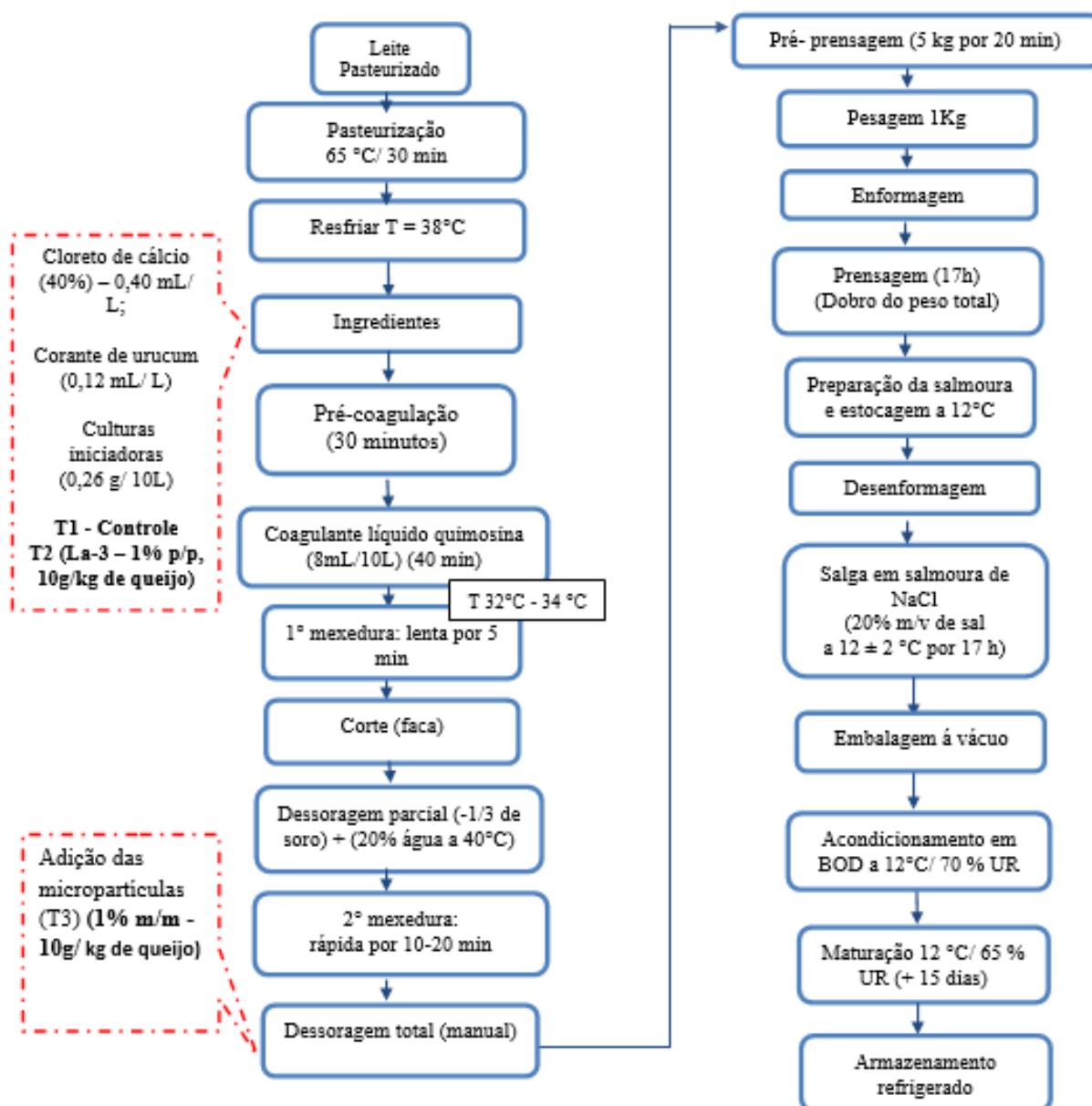


Figure 1 – Fluxograma de processamento do queijo tipo Reino adicionado de *Lb. acidophilus* livre ou microencapsulado.

3.5 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS DA MATÉRIA-PRIMA E DAS FORMULAÇÕES DE QUEIJO TIPO REINO

3.5.1 Análises Microbiológicas

Os parâmetros para análise de controle microbiológico para o leite bovino pasteurizado utilizado como matéria-prima, bem como os queijos fabricados foram coliformes a 35 °C (NMP/mL) (caldo Lauril Sulfato Triptose – Caldo LST – Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e coliformes a 45 °C (NMP/mL) (*Escherichia coli* – Caldo EC – Kasvi, São José dos

Pinhais, Paraná, Brasil); *Salmonella* spp./ 25mL ou g (ágar Bismuto Sulfito (BS) e Ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) – Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) incubados a 35-37 °C por 24 horas. Além disso, analisou-se *Staphylococcus* coagulase-positiva/g (ágar Baird-Parker – BP – Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) a 35 °C por 48 horas para os queijos e contagem padrão em placas de aeróbios mesófilos (Plate Count Agar – PCA – Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) a 30 °C por 48 horas para o leite pasteurizado conforme estabelecido pela American Public Health Association (APHA, 2001).

A avaliação da viabilidade dos lactobacilos presentes, incluindo a cultura “starter” (LH-B02 – *Lb. helveticus*) e a cultura probiótica *Lb. acidophilus* foi realizada por enumeração em ágar MRS (Merck, Rio de Janeiro – RJ), tradicionalmente empregado para enumerar *Lactobacillus* spp. termofílicos em anaerobiose a 37 °C por 72 h, e foi realizada após 1 e 25 dias de manutenção em câmara asséptica em condições já mencionadas. Sabe-se, através de testes preliminares, que a cultura R-704 composta por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, não atinge contagem superior a 4 Log UFC/ g nas mesmas condições de incubação da cultura probiótica e, portanto, não interferiu nas contagens dos lactobacilos.

3.5.2 Análises físico-químicas

O leite bovino utilizado como matéria-prima foi analisado quanto às características físicas e químicas: pH, teor de gordura (%); acidez (g ácido láctico/ 100 mL), teor de proteínas (%), resíduo mineral fixo (%), extrato seco total (%) e umidade (%) (AOAC, 2010).

Os queijos fabricados foram submetidos às análises de composição centesimal logo após o 1º dia de fabricação (tempo 1) e após a maturação (tempo 25 dias). Foram determinados parâmetros de umidade (%), sólidos totais (%), proteínas (%), cinzas (%), gordura (%). Além disso foram avaliados os parâmetros de pH, atividade de água, extrato seco total (%) e acidez titulável em ácido láctico (g ácido láctico/ 100g) (AOAC, 2010).

Análise de perfil de textura dos queijos tipo Reino foi realizada em Texturômetro modelo CT3 25K (Brookfield, Massachusetts, EUA), antes (tempo 1) e após maturação (tempo 25), empregando-se placa cilíndrica de aço inox com 5 cm de diâmetro. As análises dos queijos foram realizadas conforme Wang et al. (2011) com modificações. Avaliaram-se os parâmetros primários (firmeza, elasticidade, coesividade e adesividade) e secundários (mastigabilidade). A amostra foi preparada a fim de se obterem cubos com aresta de 1,5 cm (1,5 x 1,5 x 1,5 cm). Cinquenta (50) % da amostra foi comprimida a partir de sua altura inicial, na velocidade de 4

mm/ s, com auxílio de sonda cilíndrica de 50 mm, com repouso de 5 segundos para retorno da sonda a cada ciclo. As análises foram realizadas em quadruplicata.

A proteólise dos queijos fabricados foi determinada nos tempos 1 e 25 dias conforme metodologia de Andreatta (2007) adaptada, calculando-se os índices de extensão e de profundidade com base na determinação de nitrogênio total, nitrogênio não proteico e nitrogênio não caseico. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de enumeração dos lactobacilos obtidos foram expressos como média seguida do desvio padrão. Aplicou-se análise de variância (ANOVA) seguida da comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), para definir a melhor formulação de micropartículas baseada na maior porcentagem de sobrevivência de *Lb. acidophilus* obtida.

Aplicou-se análise de variância (ANOVA) seguida da comparação de médias pelo teste de Tukey, para definir diferenças significativas entre as formulações ao longo da maturação ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para análise dos resultados físico-químicos e perfil de textura.

Aplicou-se análise de variância (ANOVA) seguida da comparação de médias pelo teste de Dunnett, para definir diferenças significativas de T2 e T3 com relação ao controle (T1) ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para análise dos resultados da análise físico-química no tempo 1 e 25.

Utilizou-se o programa GRAPHPAD prisma, versão 6.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO 1

Physicochemical evaluation and texture profile of Reino cheese added of *Lb. acidophilus* in free form or through microparticles of sodium alginate

Physicochemical evaluation and texture profile of Reino cheese added of *Lb. acidophilus* in free form or through microparticles of sodium alginate

**¹LOPES NETO, J. H. P., ¹SILVA, A. L., ²SILVEIRA, E. S. DA., ³BRAGA, A. L. M.,
²SANTOS, J. R. F. G. DOS, ²COSTA, M. A., ⁴AMARAL, J. B. S., ^{3*}CARDARELLI, H. R.**

Postgraduate Program in Food Science and Technology, Department of Food Engineering,
Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil.

² Department of Food Engineering, Technology Center, Federal University of Paraíba, João
Pessoa, Brazil.

³ Department of Food Technology, Center for Technology and Regional Development,
Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil.

⁴ Meat and Fish Processing Laboratory, Department of Food Technology, Center for
Technology and Regional Development, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil.

ABSTRACT

Reino cheese, traditionally Brazilian, stands out for its dryness, specific aroma, intense coloration and few eyes. The Reino cheese texture is a parameter of fundamental importance, since it has the capacity to influence the quality and acceptance of the final product. There are several factors that interfere with the texture's property, such as intrinsic characteristics and the addition of particles. The objective of this study was to evaluate the physical and chemical properties and the Texture Profile (TPA) of Reino cheese added of *Lb. acidophilus* in free form or through sodium alginate microparticles. Microparticles of *Lb. acidophilus* were developed using ionic gelation technology with sodium alginate. Three cheese formulations were developed, one without the addition of *Lb. acidophilus* (T1 - control), others containing free probiotic (T2) or present via microparticles (T3). The cheeses were analyzed immediately after manufacture and after 25 days of maturation, as the physical and chemical parameters analyzed in the cheeses formulations were pH, titratable acidity, A_w , fat content, protein content, moisture, ash, and extent and depth of proteolysis indexes. The T3 and T2 formulations significantly affected the parameters of pH, fat, proteins and proteolysis extent and depth indexes, when compared to control during maturation, due to the proteolysis phenomenon. Regarding the texture profile, it was verified that the addition of the particles to the T3, did not alter the hardness, adhesiveness and cohesiveness when compared with the control. It is worth noting that T2 and T3 presented lower values for the chewability parameter compared to T1 but did not differ among themselves. Therefore, the addition of *Lb. acidophilus* in free form or encapsulated to Reino cheese resulted in a product with improved characteristics in relation to the control. Furthermore, the cheese added of microparticles becomes feasible since it provides additional protection to the microorganism, with an improvement of the texture characteristics.

Keywords: Dairy, probiotics, microencapsulation, texture.

1 INTRODUCTION

Reino cheese is notable for being considered as a fine cheese, marketed in Brazil throughout the year (TAVEIRA, 2013). It is a typical Brazilian cheese, derived from edam-type Dutch cheese, but with distinct characteristics, showing a drier, with a characteristic flavor, more intense coloration, firmer texture and few eyes (FURTADO, 2007; FURTADO, 2008). It has high added value, marketed by packaging in spherical cans, and its maturation is determinant to promote biochemical changes responsible for the sensory characteristics of the final product (TAVEIRA, 2013).

Reino cheese does not have Technical Regulation of Identity and Quality and standardization despite its importance. The lack of regulation leads to the obtaining of products with non-uniform characteristics that directly affect the rheological properties, such as texture.

The texture has a great influence on the acceptability of cheeses by directly influencing their quality (BOURNE, 2002; CRUZ, 2016). It can be defined as the sensorial and functional response of different food properties, perceived by the human senses (BOURNE, 2002). Cheeses are physically defined as viscoelastic materials, since they suffer, simultaneously, elastic and viscous deformation when subjected to a force (FOX et al., 2000). The factors influencing such food are: fat content, proteins, pH, type of processing, degree of proteolysis, moisture, and other substances intentionally added as condiments and microparticles (ANDREATTA, 2006; CAVALCANTE et al., 2007; DELGADO et al., 2011; SILVA, 2016).

The addition of microencapsulated probiotic ingredients to cheeses has been extensively studied (ETCHEPARE et al., 2016; GARCIA-CEJA et al., 2015, SILVA et al., 2018). The human health benefits that probiotics have the ability to provide encompass effects such as regulation of the gastrointestinal system, cholesterol control, immunity aid, allergies and infections that compromise the respiratory system, anticancer effects, antihypertensive, among several others (GARCIA-RUIZ et al., 2014; RIBEIRO et al., 2014). However, it is known that the addition of microparticles to food products can cause noticeable texture changes that may compromise sensory acceptance (LAWLESS; HEYMANN, 2010).

The texture can be evaluated by both sensory and instrumental tests. The first one becomes specific to each individual, consequently, there is variability according to the perception attached to each one. The instrumental methods can be measured through the imitative technique, which is based on the evaluation of the texture parameters through the real simulation of the food in the mouth (ROSENTHAL, 1999). Advantages such as reproducibility, practicality, in addition to obtaining results in a timely manner, makes instrumental methods a viable alternative for food texture analysis (BOURNE, 2002).

The texture profile analysis (TPA), is an instrumental uniaxial compression test, based on the simulation of mastication from the food compression by the probe, generating a graph of the force x time composed of two peaks representing the double compression applied to the sample thereby enabling the measurement of the mechanical parameters considered primary

such as hardness, cohesiveness, springiness, resiliency, and adhesiveness, as well as secondary such as gumminess, chewiness and fracturing (BOURNE, 2002; FOX et al., 2000).

Microparticles containing probiotics, because of their varied dimensions, can directly influence the texture and acceptance of cheeses. However, studies on the texture profile of matured cheeses added with microparticles containing probiotics are scarce. Therefore, the present study aimed to evaluate the physicochemical properties and the Texture Profile (TPA) of Reino cheese added of *Lb. acidophilus* in free form or through microparticles of sodium alginate.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1. MATERIALS, REAGENTS AND CULTURES

Bovine milk from animals of the same breed and close lactation age, purchased from Coapecal (Cooperativa Agropecuaria do Cariri Ltda.), located in the rural area of the municipality of Caturite, Paraíba, Brazil, was used. The Reino cheese was manufactured using commercial lyophilized cultures (Chr. Hansen, Valinhos, São Paulo, Brazil), *Lactobacillus helveticus* starters (LH-B02®) and homofermentative mesophilic type O (R-704®). The formulations containing probiotic received the addition of *Lactobacillus acidophilus* (LA-3®) (Sacco, Campinas, São Paulo, Brazil) culture. The materials used for the encapsulation of *Lb. acidophilus* were sodium alginate (Ultrapan, Valinhos, São Paulo, Brazil), calcium chloride dihydrate (Quimica moderna, Barueri, São Paulo, Brazil), sodium citrate P.A (Synth, Diadema, São Paulo, Brazil), ascorbic acid (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brazil) and L-Cysteine hydrochloride (Dinamica, Diadema, Sao Paulo, Brazil).

2.2. METHODS

2.2.1. Reactivation of probiotic *Lb. acidophilus* for microparticle production

The process of reactivation of the probiotic culture (*Lb. acidophilus*) maintained in glycerol was adapted from Gebara (2015) and Silva (2016) in Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS) in a ratio of 200 µL to 5 mL of media (Kasvi, Sao Jose dos Pinhais, Parana, Brazil) and incubation at 37 °C for 18 hours. The culture of the first tube was transferred to the tube containing the larger volume of MRS broth in the same ratio and incubated under the same conditions. It was centrifuged at 6000 RPM (5934 x g) (Model: 5430R, Eppendorf, Hamburg, Germany) at 20 °C for 5 minutes. The supernatant was discarded, the pellet resuspended with 14% (w/v) 0.1% (w/v) peptone water.

2.2.2. Microparticles production

Gels microparticles were formed from the extrusion drip of the 1.5% (v/v) sodium alginate biopolymer solution containing the probiotic onto a 4% (w/v) CaCl₂ gelling aqueous solution under low stirring, as adapted by Li et al. (2009); Silva et al. (2018). The biopolymer solution was dripped with a peristaltic pump (spray dryer, model B-290 - Buchi, Valinhos, Sao Paulo, Brazil) with a rotation speed of 35 RPM and atomizer nozzle of a mini spray dryer, model B-290, Valinhos, Sao Paulo, Brazil). The distance between the drop outlet and the gelling bath was set at 20 cm in order to obtain spherical microparticles. The newly formed microparticles were immersed in the CaCl₂ solution for 30 min for complete gelation. After this period, the microparticles were collected by filtration through qualitative filter paper with 18 cm diameter (Qualy, Fortaleza, Ceara, Brazil) and stored under refrigeration at 4 ± 2 °C for analysis.

2.2.3. Reino cheese production

Three formulations were made, with T1 being the control, as it contained only the lyophilized starter cultures (0.26 g /10 L milk), T2 and T3 containing in addition to the starter cultures, *Lb. acidophilus* reactivated and added (1% v/v) in free form and encapsulated *Lb. acidophilus* (1% w / w), respectively. Reino cheese production followed the methodology suggested by Furtado (2008), Taveira (2013) and Taveira et al. (2015) with modifications as described below.

The bovine milk was pasteurized (65 °C/30 min), received urucum dye (0.12 mL/L milk) (Rica Nata, Piracema, Minas Gerais, Brazil), starter cultures and calcium chloride 40% v/v) (Rica Nata, Piracema, Minas gerais, Brazil), respectively. Formulation T2 included the addition, in the pre-coagulation step, of 1% (w/w) of an *Lb. acidophilus* inoculum, as adapted from Gebara et al. (2015), obtained by concentration of cells previously reactivated as described in item 2.2.1, in order to achieve approximate viability of 10 Log CFU/mL. The coagulant (Ha-la, Chr. Hansen, Valinhos, São Paulo, Brazil) was then added and the coagulation occurred (32-34 °C/ 30-35 min), followed by curd cut (0.5 cm edge) and slow stirring for 12-15 minutes. The whey was partially drained (30% v/v in relation to the milk volume), 20% (v/v) hot water (40 °C) was added to the curd, under continuous stirring to raise the temperature by 1 °C every 2 minutes, until the temperature reached 40-43 °C and the curd was desorbed from the whey. The T3 formulation received 1% (w/w) of the microparticles after total desorption of the cheese mass. The curd was pre-pressed into the manufacturing tank for 20 minutes, and then shaped and pressed into spherical shapes containing about 1 kg of curd, using twice the total weight of the press in the press for 20 hours. After removing from the mold, the cheeses were salted in 20% (w/v) brine at 10-12 °C for 17 hours, vacuum packed in plastic containers, and placed in a chamber (Model EI: 08F1-H, Caltech, Recife, Pernambuco, Brazil) (12 ± 1 °C, 70% relative humidity) for 10 days. The cheeses were then matured for fifteen days in a chamber (12 ± 1

°C, 55-65% relative humidity) and, after this period, the packaging was removed and the paint was made with natural cochineal dye (Docina Nutrition, Juiz de Fora - MG). The cheeses were kept under refrigeration and after 1 day of manufacture and after 25 days of maturation were analyzed physically chemically as described in items 2.2.4 to 2.2.6.

2.2.4. Physicochemical analysis

The bovine milk used as raw material was analyzed for the physical and chemical characteristics: pH, fat; titratable acidity expressed as lactic acid, total dry extract as recommended by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2010).

The cheeses manufactured were submitted to the analysis of the centesimal composition after the first day of manufacture (time 1) and after maturation (time 25 days). Moisture, total solids, protein, ash and fat parameters were determined. The pH, water activity, acidity expressed as lactic acid, total solids were also evaluated (AOAC, 2010).

2.2.5. Proteolysis analysis

The proteolysis of the cheeses manufactured was determined at the times 1 and 25 days according to Andreatta (2007) methodology, calculating the percentage of extent and depth indexes based on the determination of total nitrogen, non-protein nitrogen and non-casein-nitrogen. All analyses were performed in triplicate.

2.2.6. Profile Texture Analysis (TPA)

TPA of the Reino cheeses was performed in a CT3 25K texturometer (Brookfield, Massachusetts, USA), before (time 1) and after maturation (time 25), using 5 cm diameter stainless steel cylindrical plate. The cheeses were analyzed according to Wang et al. (2011) with modifications. The primary (hardness, springiness, cohesiveness and adhesiveness) and secondary (chewiness and gumminess) parameters were evaluated. The sample was prepared in order to obtain cubes (1.5 x 1.5 x 1.5 cm). Fifty (50) % of the sample was compressed from its initial height, at a speed of 4 mm/s, with the aid of a 50 mm cylindrical probe, with a rest of 5 seconds to return the probe to each cycle. The analysis was performed in quadruplicate.

2.3 STATISTICAL ANALYSIS

Physicochemical results were expressed as mean followed by standard deviation. Analysis of variance (ANOVA) was applied followed by the comparison of means by the Dunnett test, to define significant differences of T2 and T3 in relation to the control at the significance level of 5% ($p < 0.05$).

Texture profile analysis (TPA) values were expressed as mean followed by standard deviation. An analysis of variance (ANOVA) was applied, followed by Tukey's test, to define significant differences between the samples analyzed at a significance level of 5% ($p < 0.05$), using GRAPHPAD prism software, version 6.0.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1. PHYSICOCHEMICAL ANALYSIS

Table 1 shows the results obtained for the physicochemical parameters of the cheeses of the T1, T2 and T3 formulations. It is important to point out that Reino cheese does not have a Technical Identity and Quality Regulation for physicochemical parameters, making it difficult to standardize.

It can be observed that the pH value of T2 (*Lb. acidophilus* free) and T3 (encapsulated *Lb. acidophilus*) was significantly ($p < 0.05$) lower than the control (T1) at both maturation times. The pH was significantly different during cheese maturation ($p < 0.05$), except for T3, possibly because the probiotic added in the encapsulated form did not interact with the cheese matrix.

The results obtained for titratable acidity also differed statistically ($p < 0.05$) throughout maturation, except for T3 ($p > 0.05$), which maintained a stable acidity in a consistent manner with pH results. There was no significant difference in the acidity values comparing the cheese T2 and T3 to the control (T1) at time 1 ($p > 0.05$), and, in contrast, in the time 25, a higher acidity was observed in the control in relation to the other cheeses ($p < 0.05$). Tenório (2012), when studying the application of *Lb. acidophilus* in Prato cheese, obtained values of pH and acidity that behaved in a similar way to that reported in this research during 30 days of maturation. Similarly, Chaves; Gigante (2016) observed a small decrease in pH and consequent increase of acidity when comparing the Prato cheese control with the added formulation of *Lb. acidophilus*.

The values found for this parameter in T2 and T3 did not differ in relation to T1 ($p > 0.05$), nor during maturation, but were smaller than those reported by Furtado (2008) and Taveira (2013), whose results were about 0.98 and 0.97 in Reino cheese, respectively. It is known that the water activity is influenced by the content of salt and moisture in the cheese (COGAN, 2000), and, differences in water activity can thus be explained.

For moisture content, a significantly higher moisture content was observed for T2 and T3 compared to T1 ($p < 0.05$), but there was no significant difference throughout the maturation for all formulations ($p > 0.05$). This fact can be explained by maturation, in this case, when accelerated in relation to the traditional one. Results lower than the present study were reported by Taveira (2013), being 40% for Reino cheese soon after manufacture and 33% after

36 days of maturation, however, the maturation of the cheeses was done without packaging, unlike the present study, which possibly affected the loss of water. Keys; Gigante (2016), on the other hand, found a 43% Prato cheese moisture, close to T1 and inferior to T2 and T3, yet the authors stated that there was no difference in this parameter when comparing the control cheese with the one with the probiotic.

Table 1 – Physicochemical analyses of pH, acidity, water activity, moisture, total dry extract, ashes, fats, proteins, extent and depth of proteolysis indexes (EPI and DPI) of Reino cheeses before (Time 1 day) and after maturation (Time 25 days) (mean \pm standard deviation) (n = 3).

Analysis	Formulation	Time 1	Time 25
pH	T1	5,34 \pm 0,01 ^{bA}	5,52 \pm 0,02 ^{aA}
	T2	5,20 \pm 0,01 ^{bB}	5,31 \pm 0,01 ^{aB}
	T3	5,24 \pm 0,01 ^{aB}	5,30 \pm 0,02 ^{aB}
Titratable acidity*	T1	0,86 \pm 0,02 ^{aA}	0,79 \pm 0,02 ^{bA}
	T2	0,89 \pm 0,02 ^{aA}	0,85 \pm 0,01 ^{bB}
	T3	0,88 \pm 0,05 ^{aA}	0,85 \pm 0,01 ^{aB}
Aw	T1	0,95 \pm 0,01 ^{aA}	0,95 \pm 0,01 ^{aA}
	T2	0,95 \pm 0,01 ^{aA}	0,95 \pm 0,01 ^{aA}
	T3	0,95 \pm 0,01 ^{aA}	0,95 \pm 0,01 ^{aA}
Moisture**	T1	42,98 \pm 0,08 ^{aA}	43,07 \pm 0,17 ^{aA}
	T2	47,08 \pm 0,38 ^{aB}	47,36 \pm 0,02 ^{aB}
	T3	48,64 \pm 0,59 ^{aB}	48,54 \pm 0,20 ^{aB}
TDE**	T1	57,02 \pm 0,08 ^{aA}	56,93 \pm 0,17 ^{aA}
	T2	52,92 \pm 0,38 ^{aB}	52,64 \pm 0,02 ^{aB}
	T3	51,36 \pm 0,59 ^{aB}	51,46 \pm 0,20 ^{aB}
Ash**	T1	3,87 \pm 0,10 ^{aA}	3,74 \pm 0,06 ^{aA}
	T2	4,38 \pm 0,10 ^{aB}	4,54 \pm 0,31 ^{aB}
	T3	4,41 \pm 0,13 ^{bB}	4,98 \pm 0,24 ^{aB}
Fat**	T1	25,50 \pm 0,71 ^{bA}	28,50 \pm 0,50 ^{aA}
	T2	24,75 \pm 0,35 ^{bA}	24,83 \pm 0,29 ^{aB}
	T3	23,00 \pm 0,71 ^{bB}	24,83 \pm 0,29 ^{aB}
Protein**	T1	19,89 \pm 0,39 ^{bA}	24,20 \pm 0,28 ^{aA}
	T2	21,71 \pm 0,24 ^{bB}	22,98 \pm 0,30 ^{aB}
	T3	22,90 \pm 0,12 ^{aB}	23,00 \pm 0,24 ^{aB}
EPI**	T1	1,94 \pm 0,03 ^{bA}	3,02 \pm 0,44 ^{aA}
	T2	2,40 \pm 0,02 ^{bB}	3,43 \pm 0,03 ^{aA}
	T3	2,28 \pm 0,02 ^{bB}	3,13 \pm 0,37 ^{aA}
DPI**	T1	0,64 \pm 0,01 ^{bA}	1,91 \pm 0,41 ^{aA}
	T2	1,04 \pm 0,21 ^{bA}	2,30 \pm 0,06 ^{aA}
	T3	0,99 \pm 0,21 ^{bA}	2,32 \pm 0,02 ^{aA}

Source: Authors database. *(g lactic acid/ 100g); ** %; ^{a-b} Means followed by different lowercase letters differ statistically on the same line (Tukey test, p < 0.05); ^{A-C} Means followed by different capital letters differ statistically between the formulations for each time (Dunnett's test, p < 0.05). T1 (Control); T2 (*Lb. acidophilus* free); T3 (encapsulated *Lb. acidophilus*); EPI (Extent Proteolysis Index); DPI (Depth Proteolysis Index); TDE (Total Dry Extract); Aw (Water Activity).

Total dry extract (TDE) was significantly higher (p < 0.05) in T1, however, no statistical difference was observed throughout maturation for all formulations (p > 0.05), as expected,

since this parameter is a direct consequence of moisture. Tenório (2013) found 59% TDE content for Prato cheese added of *Lb. acidophilus* soon after manufacture, higher than reported in this study, being closer to the TDE of the control formulation. The author further states that the probiotic microcapsules produced with pectin and pectin added by heat treated whey protein presented total dry extract content similar to Prato cheese with the microorganism in free form. Furtado (2008) showed considerably higher values (64-66%) in Reino cheese than in the formulations of this study.

The ash content in the T2 and T3 cheeses was significantly higher compared to T1 ($p < 0.05$) after 1 and 25 days of maturation. It is attributed to the possible interactions of the culture added in T2, which contributed to the maintenance of the minerals in the curd, avoiding less loss in the desorption phase, as well as the addition of sodium alginate particles to T3. Similarly, Tenório (2012) reported intermediate value (4.11%) to the cheese formulations of the present study for Prato cheese added of free probiotic culture soon after manufacture. In addition, the author reports that there was no statistical difference when comparing the cheese added with free probiotic with the addition of pectin microcapsules. On the other hand, Taveira (2013) analyzed Reino cheese after 2 days of production and 36 days of maturation and reported values of 3.53% and 4.17% of ash respectively, both lower than those found in this study.

Fat content differed significantly ($p < 0.05$) throughout maturation for all treatments. The formulation containing *Lb. acidophilus* in free form (T2) did not differ from control ($p > 0.05$) at time 1, while T3 presented a significantly lower value ($p < 0.05$). In results after 25 days of maturation, it was observed that both T2 and T3 had fat contents lower than T1 ($p < 0.05$).

Results for fat contents higher (28%) to treatments T2 and T3 of this study were reported by Chaves; Gigante (2016), who found no difference between the control and the formulation added of the free probiotic. However, Taveira (2013) reported a 30% fat content in Reino cheese, soon after manufacture, which increased after 36 days of maturation (31.25%). There are several factors responsible for this observed variation, including race, diet, time of year and physiological factors of the cows that produced the milk used. Therefore, this parameter must be standardized in the raw material for further processing in order to obtain cheeses with the desired characteristics (CEBALLOS et al., 2009). In addition to the aforementioned factors, the fat increase during maturation is attributed to the biochemical phenomenon called lipolysis, which is responsible for the hydrolysis of triacylglycerols to fatty acids as primary products and subsequently ketones, lactones, aldehydes, secondary alcohols and carbon dioxide as secondary (EL SODA, 1995).

The protein content was significantly higher in T2 and T3 ($p < 0.05$) at time 1, however, a significantly higher value was observed for T1 after 25 days of maturation ($p < 0.05$), whose values were similar to reported by Chaves; Gigante (2016) for cheese added of probiotic *Lb.*

acidophilus after 1 day of manufacture. Zhang et al. (2013) also reported higher values in protein content (24%), but the results showed that the cheese added of the probiotic did not differ from the control in that parameter. While for Ong; Shah (2009) the protein content in cheddar cheeses added of different strains of *Lb. acidophilus* increased when compared to control cheese after 1 day of manufacture, showing similar results to this research.

Lactic cultures like *Lb. acidophilus* and *Lb. helveticus*, can produce intracellular peptidases, which are responsible for a more intense proteolysis (BERGAMINI et al., 2005). The proteolysis extent (EPI) and depth (DPI) indexes were significantly higher throughout maturation for all formulations ($p < 0.05$). It was observed that in time 25 there was no statistical difference ($p > 0.05$) for T2 and T3 compared to T1 (control), not influencing the presence of the free culture as a proteolysis enhancer. Furthermore, the DPI of T2 and T3 did not differ from the control for both times ($p > 0.05$), being lower than reported in the literature with similar maturation time (BEZERRA, 2015; SILVEIRA, 2009).

It is evidenced that the maturation time may have influenced the proteolysis, since this is based on the release of the free amino acids from the hydrolysis of the peptides. All formulations presented lower values than those found by Bezerra (2015) for Coalho cheese after 1 day of manufacture, reporting values of 4% for both index. Silveira (2009) highlighted values above 4% and 1.47% for EPI and DPI, respectively, in Prato cheese control, showing also higher values than reported in this study. Taveira (2013) when analyzing traditional Reino cheese, reported much higher values for EPI and DPI, 15.78 and 9.50%, respectively, after 36 days of maturation.

3.2. ANALYSIS OF THE TEXTURE PROFILE

The texture profile of the Reino cheese is shown in Figure 1, indicating the presence of the primary attributes (hardness, adhesiveness, cohesiveness, springiness) and secondary attributes (chewiness). It can be noticed that the behavior of the texture graph for the Reino cheese presented a concave shape that is directly related to the hardness aspect of the cheese. Todescatto (2013) claims to obtain a graph with characteristics and similar forms for a texture profile from a typical cheese from Paraná.

TPA's principle is to obtain the texture parameters generating curves (force x time) from the double compression food simulating chewing (Fox et al., 2000; Bourne, 2002). It is known that the hardness is the force (N) assigned the initial deformation, corresponding to the maximum value of the first cycle (H) (GUNASEKARAN; AK, 2003).

Area 3 is equivalent to the parameter adhesiveness expressed in unit of energy, which for Reino cheese, it's presented in reduced form. Cohesiveness in the other hand is defined as resistance to the intrinsic bonds to the food and can be obtained by the ratio of the area of the second cycle by the first. Obtaining the springiness, given by the ratio t_2 / t_1 , which

represents the level at which the sample resumes its initial shape. With regard to chewiness, it is considered the energy necessary to fragment the food until it is fit to be ingested, being dependent on the product of gumminess by cohesiveness (GUNASEKARAN; AK, 2003).

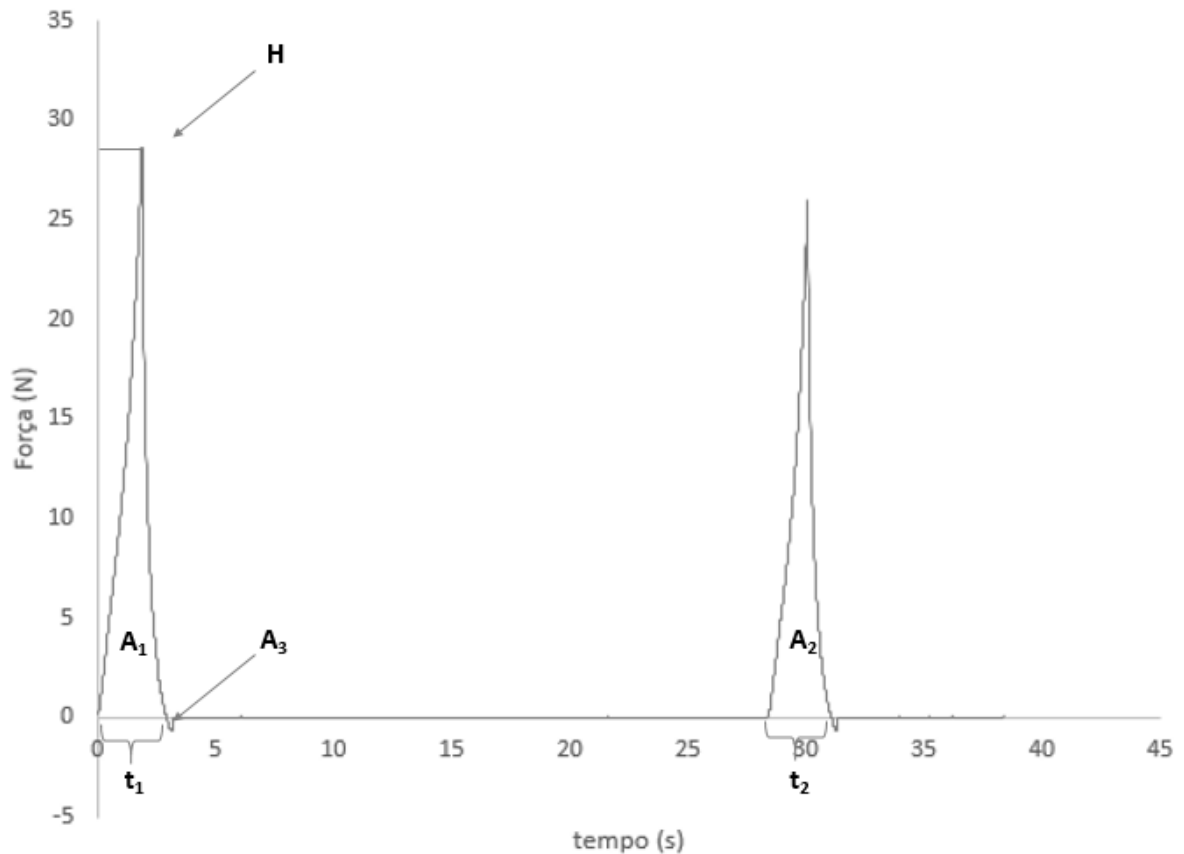


Figure 1 – Reino Cheese Texture Profile Analysis Graph (N/ s). H (Hardness); A₁ (area 1); A₂ (area2); A₃ (area 3); t₁ (time 1); t₂ (time 2).

The values obtained for the texture profile parameters of the processed Reino cheeses are explained in Table 2. The firmness of all treatments differed statistically ($p < 0.05$) throughout maturation, reaching higher values for the control treatment (T1). At time 1, it was observed that T2 did not differ from T3 ($p > 0.05$); besides, after maturation, no difference was observed between the three treatments. It is observed that the maturation time was a determinant factor to obtain lower values of firmness, and that the addition of the microparticles (T3), as well as the *Lb. acidophilus* in free form (T2) did not influence this attribute after maturation. Similar behavior was reported by Wang et al. (2011), which shows a significant fall in firmness during the maturation period of Cheddar cheese, although it reports about 41.04 ± 2.32 N, higher values than the one found in this study. The parameter of proteolysis of mature cheeses, like Reino type, affects the texture, since it is based on the breakdown of proteins into peptides of varied sizes, later to be hydrolyzed releasing free amino acids (McSWEENEY, 2004a; 2004b; UPADHYAY et al, 2004), which affect the protein network and alter the texture parameter and consequently confers lower hardness (DELGADO, 2012).

Table 2 – Values of the texture parameters of Reino cheese with or without the addition of *Lb. acidophilus*.

Analysis	Treatment	time 1	time 25
Hardness (N)	T1	29,25 ± 1,66 ^{aA}	17,90 ± 0,87 ^{bA}
	T2	20,87 ± 1,20 ^{aB}	15,56 ± 0,42 ^{bA}
	T3	21,08 ± 1,27 ^{aB}	17,68 ± 1,03 ^{bA}
Adhesiveness (mJ)	T1	0,90 ± 0,46 ^{aA}	1,50 ± 0,83 ^{aA}
	T2	1,28 ± 0,70 ^{aA}	2,13 ± 0,39 ^{aA}
	T3	1,20 ± 0,89 ^{aA}	2,48 ± 0,84 ^{aA}
Cohesiveness	T1	0,71 ± 0,09 ^{aA}	0,45 ± 0,05 ^{bA}
	T2	0,42 ± 0,10 ^{aB}	0,27 ± 0,05 ^{bB}
	T3	0,44 ± 0,04 ^{aCB}	0,34 ± 0,01 ^{aBA}
Springiness	T1	0,86 ± 0,02 ^{aA}	0,73 ± 0,07 ^{aA}
	T2	0,74 ± 0,10 ^{aA}	0,50 ± 0,09 ^{bB}
	T3	0,78 ± 0,04 ^{aA}	0,56 ± 0,02 ^{bCB}
Chewiness (N)	T1	18,24 ± 2,49 ^{aA}	5,82 ± 1,21 ^{bA}
	T2	6,47 ± 1,99 ^{aB}	2,07 ± 0,66 ^{bB}
	T3	7,31 ± 0,95 ^{aB}	3,30 ± 0,24 ^{bAB}

Source: Direct search. ^{a-b} Means followed by different lowercase letters differ statistically on the same line (Tukey test, $p < 0.05$); ^{A-C} Means followed by different capital letters differ statistically between the formulations for each time (Tukey's test, $p < 0.05$). T1 (Control); T2 (*Lb. acidophilus* free); T3 (encapsulated *Lb. acidophilus*).

It is worth noting that the treatments with higher moisture contents and proteins presented lower hardness (T2 and T3), since the proteolysis is responsible for the disintegration of the protein network, decreasing the texture (DELGADO, 2012). Furtado (2008) studied Reino cheese with different maturation conditions and obtained a range of values that corroborate the present study (16-29 N). Queiroga et al. (2013) studied the texture profile of matured Coalho cheese made with bovine milk, goats and mixtures of both, and found no difference in the hardness parameter during the 28-day maturation period.

The adhesiveness values of the T1, T2 and T3 cheeses were presented without statistical difference ($p > 0.05$) throughout the maturation for each treatment, as well as between the treatments at times 1 and 25. As expected, the probiotic particles inserted into the cheese, as well as the probiotic culture in free form did not influence the adhesiveness parameter. The values of this parameter for T1, T2 and T3 revealed that the sample does not adhere to the probe, therefore it does not bind to the palate. Buriti; Cardarelli; Saad (2008) found much higher values (9 - 23 N/s) when evaluating such parameter for probiotic, symbiotic and control petit-suisse cheese, which was already expected, since adhesiveness is the response of tensile forces between the surfaces of the food and the probe (GUNASEKARAN; AK, 2003), presenting in greater evidence in cheese with creamy characteristics.

Cohesiveness presented significant values for T1 and T2 ($p < 0.05$), but T3 remained constant after 25 days of maturation. Contrary behavior was observed at time 25, in which T2

presented lower value for such parameter differing from the treatment without addition of probiotics. It is also worth noting that T3 did not differ from T1, being evident that the addition of microparticles was not able to cause change in this parameter for Reino cheese. Values reported by Fogaça (2014) evaluating Coalho cheese added of different acids, corroborated with the results found in this study. However, Furtado (2008) found a mean value of 0.68 for Reino cheese, being close only to the control treatment and time 1. Wang et al. (2011) reported values close to the one reported in this study (0.47 and 0.46) for Cheddar cheese processed with a maturation period of 10 and 30 days, respectively. Due to the fact that cohesiveness is related to the interactions of the intrinsic forces to the product, it can be seen that although the processed Reino cheese formulations do not present relatively high values, they presented a cohesive and rubbery characteristic.

Regarding springiness, although there was no difference between treatments at time 1 ($p > 0.05$), it was observed that after maturation, the control treatment (T1) showed a difference when compared to the others ($p < 0.05$), but the formulation containing free probiotic did not differ when added in the encapsulated form ($p > 0.05$). Wang et al. when studied the effects of proteolysis on the texture of natural and processed Cheddar cheese reported average values similar to the present study, with 0.52 after 30 days of maturation for processed and higher value for natural cheese (0.70). Todescatto (2014) found a range of values (0.82 - 0.88) close to the one found in this study for T1 (0.77), for a typical cheese of Paraná state. The peptides generated in the cheese by the action of the coagulant, bacterial action or proteolysis influence the texture at the beginning of maturation, gradually decreasing the cohesive and elastic structure of the cheese (LAW, 2001). Therefore, the cheeses added of probiotics, either free (T2) or encapsulated (T3) influenced the parameter of elasticity after maturation, possibly by the formation of protein derivatives that gave a lower elastic appearance to the cheeses.

Regarding chewiness, T2 and T3 was statistically different from T1 ($p < 0.05$), but did not differ ($p > 0.05$) at time 1 and 25. During maturation, a difference was found for all three treatments ($p < 0.05$). As we know, by definition, chewing is the energy needed to break food down to the point of being ingested, so it can be seen that the control treatment, which obtained values much higher than T2 and T3, requires a higher energy expenditure for swallowing the food. Queiroga et al. (2013) when evaluating Coalho cheese made with a mix of goat and bovine milk registered higher value when compared to cheeses made with only goat or bovine milk, but these values are still lower than reported in the present research. It is worth pointing out that the results obtained during maturation show similarity to those presented by Todescatto (2014), which affirms a decrease in chewiness during the maturation of typical Parana cheese, consequently decreasing the energy expended to swallow the food.

4 CONCLUSION

The results presented, for the Reino-type cheeses, allowed to understand the influence of the addition of free probiotic or encapsulated during the period of twenty-five days of maturation, with their physicochemical properties and texture profile. It shows the influence of probiotic culture in both free and encapsulated form under the parameters of moisture, fat, protein and extent and depth of proteolysis indexes.

It was observed that the cheeses added of probiotics presented similar results regarding the parameters of hardness, adhesiveness, springiness and chewiness. The control cheese presented higher values for most of the texture parameters compared to the cheeses added with probiotics. In addition, the positive effect in this aspect for Reino cheeses added of probiotics is observed, due to the significant decrease in hardness and chewiness during maturation, possibly due to the action of *Lb. acidophilus* added in the treatments in question. It is noted that the addition of the sodium alginate microparticles to the T3 did not influence the texture aspect, possibly due to the low concentration of capsules (1% w/w).

Therefore, the addition of *Lb. acidophilus* in free form or encapsulated to Reino cheese resulted in a product with improved characteristics in relation to the control. Moreover, the cheese added with the microparticles becomes feasible since it provides additional protection to the microorganism, also improving the texture characteristics.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Coordination for the Improvement of Higher Education (CAPES) for financial aid scholarships.

REFERENCES

- Association of Official Analytical Chemists. 2014. Official Methods of Analysis. 18th ed, 3th Review, Washington: AOAC, p.1094.
- ANDREATTA, E. 2006. Avaliação da qualidade dos queijos minas frescal e tipo Mussarela produzidos com leite contendo diferentes níveis de células somáticas. Pirassununga, São Paulo: Universidade de São Paulo, tese de doutorado.
- ANDREATTA, E., FERNANDES, A. M., SANTOS, M. V. DOS., LIMA, C. G. DE., MUSSARELLI, C., MARQUES, M. C., OLIVEIRA, C. A. F. 2007. Effects of milk somatic cell count on physical and chemical characteristics of mozzarella cheese. The Australian Journal of Dairy Technology 62(3): 166-170.
- BERGAMINI, C. V., HYNES, E. R., QUIBERONI, A., SUÁREZ, V. B., ZALAZAR, C. A. 2005. Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. Food Research International 38: 597-604.
- BEZERRA, T. K. A. 2015. Estudo da proteólise, lipólise e compostos voláteis em queijo de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas. João Pessoa, Paraíba: Universidade Federal da Paraíba, dissertação de mestrado.
- BOURNE, M. 2002. Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement p. 415. San Diego: Academic Press.
- BURITI, F. C. A., CARDARELLI, H. R., SAAD, S. M. I. 2008. Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: implicações da adição de *Lactobacillus paracasei* e inulina. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas 44(1): 75-84.

- CARDARELLI, H. R., BURITI, F. C. A., CASTRO, I. A., SAAD, S. M. I. 2007. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially symbiotic *petit-suisse* cheese. *Food Science and Technology* 41: 1037-1046.
- CAVALCANTE, J. F. M., ANDRADE, N. J., FURTADO, M. M., FERREIRA, C. L. L. F., PINTO, C. L. O., ELARD, E. 2007. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura lática endógena. *Ciência e Tecnologia Alimentos* 27(1): 205-214.
- CEBALLOS, L. S., MORALES, E. R., ADARVE, G. DE LA TORRE., CASTRO, J. D., MARTÍNEZ, L. P., SAMPELAYO, M. R. S. 2009. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of Food Composition and Analysis* 22(4): 322-329.
- CHAVES, K. S., GIGANTE, M. L. 2016. Prato cheese as suitable carrier for *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium* Bb12. *International Dairy Journal* 52: 10-18.
- COGAN, T. M. 2000. Cheese microbiology. In: *Fundamental of cheese science*. Gaithersburg: Aspen Publishers.
- CRUZ, G, A. 2016. Caracterização de queijo coalho processados com cultivos láticos endógenos e substitutos de gordura. Fortaleza, Ceará: Universidade Federal do Ceará, dissertação de mestrado.
- DELGADO, F. J., GONZÁLEZ-CRESPO, J., CAVA, R., RAMÍREZ, R. 2012. Changes in microbiology, proteolysis, texture and sensory characteristics of raw goat milk cheeses treated by high-pressure at different stages of maturation. *Food Science and Technology* 48(2): 268-275.
- DELGADO, F. J., GONZÁLEZ-CRESPO, J., CAVA, R., RAMÍREZ, R. 2011. Proteolysis, texture and colour of raw goat milk cheese throughout the maturation. *European Food Research and Technology* 233(3): 483-488.
- EL SODA, M. 1995. Acceleration of flavour formation during cheese ripening. G. Charalambous, *Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence*. p.721-746.
- ETCHEPARE, M. A., RADDATZ, G. C., FLORES, E. M. M., ZEPKA, L. Q., JACOB-LOPES, G. C., BARIN, J. S., GROSSO, C. R. F., MENEZES, C. R. 2016. Effect of resistance starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *Food Science and Technology* 65: 511-517.
- FOGAÇA, D. N. L. 2014. Avaliação de propriedades mecânicas, físico-químicas e influência do tipo de acidificante e tempo de armazenamento visando à aplicação no controle do processo de produção de queijos de coalho. Itapetinga, Bahia: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, dissertação de mestrado.
- FOX, P.F., GUINEE, T.P., COGAN, T.M, McSWEENEY, P.L.H. 2000. *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg: Aspen, p. 587.
- FURTADO, M. M. 2007. Queijo com olhaduras. 1 ed. São Paulo: Fonte Comunicações, p.179.
- FURTADO, M. R. A. 2008. Caracterização histórica, tecnologia de fabricação, características físico-químicas, sensoriais, perfil de textura e de comercialização do queijo Reino. Lavras, Minas Gerais: Universidade Federal de Lavras, tese de doutorado.
- GARCÍA-CEJA, A., MANI-LÓPEZ, E., PALOU, E., LÓPEZ-MALO, A. 2015. Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined *lactobacilli* encapsulated in alginate or alginate-chitosan. *Food Science and Technology* 63(1): 482-489.
- GARCIA-RUIZ, A., LLANO, D. G., ESTEBAN-FERNÁNDEZ, A., REQUENA, T., BARTOLOMÉ, B., MORENO-ARRIBAS, V. 2014. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food microbiology* 44: 220-225.
- GEBARA, C., RIBEIRO, M. C. E., CHAVES, K. S., GANDARA, A. L. N., GIGANTE, M. L. 2015. Effectiveness of different methodologies for the selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* La5 from yoghurt and Prato cheese. *Food Science and Technology* 64(1): 508-513.
- GUNASEKARAN, S., AK, M.M. 2003. *Cheese Rheology and Texture*. CRC Press LLC, Florida, p. 637.
- LAW, B. A. 2001. Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies. *International Dairy Journal*, Barking 11(4-7): 383–398.

- LI, X. Y., CHEN, X. G., CHA, D. S., PARK, H. J., LIU, C. S. 2009. Microencapsulation of a probiotic bacteria with alginate-gelatin and its properties. *Journal of Microencapsulation* 26(4): 315-324.
- LAWLESS, H. T., HEYMANN, H. 2010. *Sensory evaluation of food: Principles and practices* 2nd ed. Berlin: Springer.
- McSWEENEY, P. L.H. 2004a. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology* 57(2-3): 127-144.
- McSWEENEY, P. L. H. 2007. *Cheese problems solved*. Woodhead Publishing Limited, England.
- McSWEENEY, P.L.H. 2004b. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Biochemistry of cheese ripening: introduction and overview*. London: Elsevier: General Aspects, (3 ed),1: 347-360.
- ONG, L., SHAH, N. P. 2009. Probiotic Cheddar cheese: Influence of ripening temperatures on survival of probiotics microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. *Food Science and Technology* 42(7): 1260-1268.
- QUEIROGA, R. C. R. E., SANTOS, B. M., GOMES, A. M. P., MONTEIRO, M. J., TEIXEIRA, S. M., SOUZA, E. L. DE., PEREIRA, C. J. D., PINTADO, M. M. E. 2013. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats' cows' milk and their mixture. *Food Science and Technology* 50(2): 538-544.
- RIBEIRO, M. C. E., CHAVES, K. S., GEBARA, C., INFANTE, F. N. S., GROSSO, C. R. F., GIGANTE, M. L. 2014. Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. *Food Research International*. 66: 424-431.
- ROSENTHAL, A.J. 1999. Relation between instrumental and sensory measures of food texture. In: ROSENTHAL, A.J., ed. *Food texture: measurement and perception*. Gaithersburg: Aspen.
- SILVA, K. C. G. 2016. Produção de microgéis simbióticos de gelatina-alginato e simulação da liberação controlada em condições gastrointestinais. Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, dissertação de mestrado.
- SILVA, K. C. G, CEZARINO, E. C., MICHELON, M., SATO, A. C. K. 2018. Symbiotic microencapsulation to enhance *Lactobacillus acidophilus* survival. *Food Science and Technology* 89: 503-509.
- SILVEIRA, A. C. 2009. Fabricação e avaliação da maturação de queijo Prato obtido a partir de leite pré-acidificado com CO₂ e redução de coagulante. Campinas, São Paulo: Faculdade de Engenharia de Alimentos, dissertação de mestrado.
- TAVEIRA, L. B. 2013. Aspectos Físico-químicos e Sensoriais do Queijo do Reino maturado sob Diferentes Concentrações, Visando a Exportação. Juiz de Fora, Minas Gerais: Universidade Federal de Juiz de Fora, dissertação de mestrado.
- TENÓRIO, C. G. M. S. C. 2012. Microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* e aplicação em queijo prato. 2012. 157p. Campinas, São Paulo: Faculdade de Engenharia de Alimentos, tese de doutorado.
- TODESCATTO, C. 2014. Obtenção de fermento láctico endógeno para produção de queijo típico da mesorregião sudoeste Paraná. Pato Branco, Paraná: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, dissertação de mestrado.
- UPADHYAY, V. K., MCSWEENEY, P. L. H., MAGBOUL, A. A. A., & Fox, P. F. 2004. Proteolysis in cheese during ripening. *Cheese: chemistry, physics and microbiology* 1(3), 391-434.
- WANG, F., ZHANG, J. L., GUO, H., ZENG, S. S., REN, F. 2011. Effect of proteolysis and calcium equilibrium on functional properties of natural cheddar during ripening and the resultant processed cheese. *Journal of Food Science* 76 (3): 248-253.
- ZHANG, L., ZHANG, X., LIU, C., LI, C., LI, S., LI, T., DA LI, ZHAO, Y., YANG, Z. 2013. Manufacture of Cheddar cheese using probiotic *Lactobacillus plantarum* K25 and its cholesterol-lowering effects in a mice model. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29(1): 127-135.

ARTIGO 2**DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO TIPO REINO ADICIONADO DE *Lactobacillus acidophilus* (LA-3) MICROENCPSULADO**

DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO TIPO REINO ADICIONADO DE *Lactobacillus acidophilus* (LA-3) MICROENCAPSULADO

LOPES NETO, J. H. P.¹; SILVA, A. L.¹; SANTOS, M. C. G.¹; CAMPOS, M. I. F.¹; LEITE, K. S.²;
MADRUGA, M.; S.⁴; BRAGA, A. L. M.³; CARDARELLI, H. R.^{3*}

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

² Programa de Pós-graduação em Engenharia de Mecânica, Departamento de Engenharia Mecânica, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

³ Departamento de Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

⁴ Laboratório de Análises Químicas de Alimentos, Departamento do Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

Resumo

A adição de *Lb. acidophilus* a matrizes lácteas como queijos pode trazer benefícios ao organismo humano. A viabilidade dos probióticos em queijos maturados, como o tipo Reino, pode ser mantida pela microencapsulação dos mesmos associada à adição de ácido ascórbico e hidrócloro de L-cisteína, que comprovadamente favorecem a multiplicação de bactérias lácticas anaeróbias e/ou microaerofílicas com potencial funcional como *Lb. acidophilus*, visto que não são capazes de resistir às condições severas do sistema gastrointestinal humano. Esta pesquisa teve como principal objetivo desenvolver formulações de queijo tipo Reino contendo o probiótico *Lb. acidophilus* livre ou microencapsulado a fim de obter um produto com potencial funcional. Micropartículas de *Lb. acidophilus* foram desenvolvidas utilizando a tecnologia de gelificação iônica com alginato de sódio (F1) aditivado de hidrócloro de L-cisteína (F2) ou ácido ascórbico (F3) ou ambos (F4), a fim de favorecer a sobrevivência das bactérias lácticas adicionadas. As micropartículas foram caracterizadas quanto a morfologia; distribuição e tamanho das micropartículas e a viabilidade do probiótico foi monitorada ao longo da vida de prateleira (60 dias). Três formulações de queijo foram desenvolvidas, uma sem adição de *Lb. acidophilus* (T1 - controle), outras contendo o probiótico livre (T2) ou presente via micropartículas (T3). Os queijos foram analisados logo após fabricação (1 dia) e após 25 dias de maturação, quanto aos parâmetros microbiológicos de controle de qualidade e ao percentual de sobrevivência dos *Lactobacillus* spp. A micropartícula F3 apresentou melhores resultados quanto ao percentual de sobrevivência do *Lb. acidophilus* durante a vida de prateleira associados com a eficiência do processo de microencapsulação. Apresentou características morfológicas (esférica, lisa e uniforme) e diâmetro médio ($58 \pm 1,51 \mu\text{m}$) que favoreceu sua incorporação ao queijo tipo Reino. O queijo adicionado de *Lb. acidophilus* na forma livre (T2) apresentou viabilidade de lactobacilos totais menor ($7,3 \pm 0,05 \text{ Log UFC/ g}$) quando comparada com o controle ($7,9 \pm 0,03 \text{ Log UFC/ g}$) após o período maturação. Entretanto, a formulação adicionada das micropartículas apresentou viabilidade acima de 8 Log UFC/ g, evidenciando manutenção do micro-organismo. Portanto, a microencapsulação de *Lb. acidophilus* atuou de forma protetiva beneficiando a sobrevivência celular microbiana, e, conseqüentemente, obteve-se um queijo Reino com potencial funcional.

Palavras-chaves: Laticínios, probiótico, potencial funcional, gelificação iônica.

Abstract

The addition of *Lb. acidophilus* to dairy matrices like cheeses can bring benefits to the human body. The viability of probiotics in matured cheeses, such as the Reino type, can be maintained by the microencapsulation of the same ones, associated with the addition of ascorbic acid and L-cysteine hydrochloride, which have been shown to favor the multiplication of anaerobic and/or microaerophilic lactic bacteria with functional potential like *Lb. acidophilus*, since they are not able to withstand the severe conditions of the human gastrointestinal system. This research had as main goal the development of formulations of Reino cheese containing or not free or microencapsulated *Lb. acidophilus* in order to obtain a product with functional potential. Microparticles of *Lb. acidophilus* were developed using ionic gelation technology with sodium alginate (F1) added by L-cysteine hydrochloride (F2) or ascorbic acid (F3) or both (F4) in order to promote the survival of the added lactic acid bacteria. Microparticles were characterized according of morphology; distribution and size of the microparticles; *Lb. Acidophilus* resistance to gastrointestinal conditions *in vitro*; and shelf life monitoring (60 days). Three cheese formulations were developed, one without addition of *Lb. acidophilus* (T1 - control), others containing free probiotic (T2) or present one via microparticles (T3). The cheeses were analyzed immediately after manufacture and after 25 days of maturation, regarding the microbiological parameters of quality control and the survival percentage of *Lactobacillus* spp. The F3 microparticle presented better results as the survival percentage of *Lb. acidophilus* during shelf life associated with the efficiency of the microencapsulation process. It presented morphological characteristics (spherical, smooth and uniform) and medium diameter ($58 \pm 1,51 \mu\text{m}$) that favored its incorporation to Reino cheese. The cheese added by *Lb. acidophilus* in the free form (T2) presented viability of *Lactobacillus* spp. lower ($7,3 \pm 0.05 \text{ Log CFU/ g}$) than when compared to the control ($7.9 \pm 0.03 \text{ Log CFU/ g}$) after the maturation period. However, the added formulation of the microparticles presented above 8 Log CFU/ g, evidencing maintenance of the microorganism. Therefore, it is realized that the microencapsulation of *Lb. acidophilus* acted in a protective way benefiting the cellular survival, consequently developing a potential functional product.

Keywords: Dairy products, probiotic, functional potential, ionic gelation.

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos funcionais têm a capacidade de produzir, além das funções nutricionais, efeitos metabólicos e fisiológicos no organismo ao serem ingeridos (VIDAL, 2012; CENCIC; CHINGWARU, 2010). Dentre eles incluem-se os probióticos, definidos como “microorganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício a saúde do hospedeiro” (HILL et al., 2014). Estes podem atuar produzindo efeitos positivos frente a diarreia, constipação, doenças anti-inflamatórias, entre outras (PANDEY; NAIK; VAKIL, 2015).

As culturas probióticas mais empregadas são bactérias lácticas e pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (TRIPATHI; GIRI, 2014). Produtos lácteos como leites

fermentados, fórmulas infantis, sorvetes e queijos têm sido suplementados com culturas potencialmente probióticas (KENT; DOHERTY, 2014). Diferentes tipos de queijos com potencial probiótico vem sendo alvo de estudos (BEZERRA, 2015; LIMA et al., 2014; CARDARELLI et al., 2007; BURITI et al., 2005b; ABADÍA-GARCÍA et al., 2013), todavia sua comercialização ainda é pequena, principalmente dos queijos maturados, apesar dos esforços dos pesquisadores no desenvolvimento de queijos com tempos de maturação variados como veículo para probióticos (ZHANG et al., 2013; GONZÁLEZ-OLIVARES et al., 2014; TENÓRIO, 2012).

O queijo tipo Reino é um queijo brasileiro tradicional originário do Edam holandês e bastante consumido. Sofre maturação adquirindo características sensoriais peculiares como coloração alaranjada intensa, seco, firme e picante (FURTADO, 2007). Cruz et al. (2009); Hayes et al. (2006); Mirzaei; Pourjafar; Homayouni (2012) consideram que queijos são importantes veículos para as culturas probióticas, devido ao alto teor de proteínas e gorduras, favorecendo a estabilidade da cultura durante o armazenamento e consumo do mesmo. Vale destacar que dentre as culturas lácticas iniciadoras utilizadas para fabricação do queijo tipo Reino está o *Lactobacillus helveticus* que vem ganhando destaque também pelo seu potencial funcional nos produtos que o contém (LECLERC et al., 2002).

Culturas potencialmente probióticas devem permanecer viáveis no alimento até seu consumo, além de sobreviverem às condições adversas do organismo ao serem ingeridas. Entretanto, parte desses micro-organismos não possuem esta capacidade, comprometendo a promoção dos efeitos benéficos atribuídos a eles (KIM et al., 2008; LI et al., 2011; RAJAM et al., 2012). Santiesteban-López et al. (2013) e Talwalkar; Kailasapathy (2004) afirmam que modificar fatores intrínsecos do produto pode afetar a sobrevivência dos micro-organismos probióticos. Assim, a diminuição do potencial de oxidorredução pela menor quantidade de oxigênio dissolvida no meio, favorece a sobrevivência de bactérias com potencial funcional. Sugerem que a L-cisteína e o ácido ascórbico podem agir sinergicamente favorecendo a sobrevivência desses micro-organismos.

Ribeiro et al. (2014) destacam a necessidade de fazer uso de tecnologias inovadoras como alternativa para controlar a sobrevivência das bactérias probióticas. A microencapsulação é um processo tecnológico capaz de proteger os compostos bioativos, como os micro-organismos, com auxílio de biopolímeros, como exemplo o alginato (NAZZARO et al., 2012). Além do controle de sobrevivência microbiana, destaca-se a função de barreira, pois o produto adicionado de culturas potencialmente probióticas na forma livre pode apresentar suas

características originais alteradas, ocasionando sua possível descaracterização (GARCÍA-CEJA et al., 2015; SILVA, et al., 2018).

Neste contexto, os queijos maturados como o tipo Reino podem ser funcionais pela adição de outras bactérias lácticas com potencial probiótico como *Lb. acidophilus*, mantendo suas características.

Assim, esta pesquisa teve como objetivo desenvolver formulações de queijo tipo Reino adicionado do probiótico *Lb. acidophilus* microencapsulado a fim de obter um produto com potencial funcional. Para tal, micropartículas de *Lb. acidophilus* foram desenvolvidas utilizando a tecnologia de gelificação iônica com alginato, aditivado de hidrócloro de L-cisteína e ácido ascórbico a fim de favorecer a sobrevivência das bactérias adicionadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATÉRIA-PRIMA, REAGENTES E CULTURAS

O leite de vaca utilizado foi da mesma raça (Nelore), fase de lactação próxima e criada por sistema produtivo semi-intensivo, adquirido da Coapecal (Cooperativa Agropecuária do Cariri Ltda.), localizada na zona rural do município de Caturité, Paraíba, Brasil. O queijo tipo Reino foi fabricado utilizando culturas liofilizadas comerciais (Chr. Hansen, Valinhos, São Paulo, Brasil) “starter” *Lactobacillus helveticus* (LH-B02®) e mesofílicas homofermentativas tipo O (R-704®). As formulações contendo probiótico receberam adição da cultura *Lactobacillus acidophilus* (LA-3®) (Sacco, Campinas, São Paulo, Brasil). Os materiais utilizados para a encapsulação de *Lb. acidophilus* foram alginato de sódio (Ultrapan, Valinhos, São Paulo, Brasil), cloreto de cálcio dihidratado (Química moderna, Barueri, São Paulo, Brasil), citrato de sódio P.A (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), ácido ascórbico (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) e hidrócloro de L-Cisteína (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil).

2.2 MICROENCAPSULAÇÃO

2.2.1 Delineamento experimental

A pesquisa foi desenvolvida através de experimentos que testaram os fatores ácido ascórbico e hidrócloro de L-Cisteína, adicionados na proporção de 0,04% (p/v) na elaboração das micropartículas, para determinar a influência dessas variáveis na porcentagem de

sobrevivência de *Lb. acidophilus* microencapsulado. As formulações elaboradas foram F1 (Alginato puro); F2 (Alginato + L-Cisteína); F3 (Alginato + Ác. Ascórbico); F4 (Alginato + L-Cisteína + Ác. Ascórbico), preparadas aleatoriamente.

As micropartículas produzidas foram armazenadas a 4 ± 2 °C para acompanhamento da viabilidade (Log UFC/g) durante 0, 20 e 30 e 60 dias. Após a escolha da formulação de micropartículas com maior porcentagem de sobrevivência do probiótico, procedeu-se a caracterização das mesmas quanto a morfologia; distribuição e tamanho. Finalmente, as micropartículas foram aplicadas na matriz alimentar, isto é, por incorporação a uma formulação de queijo tipo Reino. Todas as formulações foram realizadas em triplicata.

2.2.2 Reativação de *Lb. acidophilus*

O processo de reativação da cultura probiótica (*Lb. acidophilus*) mantida em glicerol foi adaptado de Gebara (2015) e Silva (2016), o qual envolveu a reativação em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) a 4% (v/v) (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e incubação a 37 °C por 18 horas. Feito isso, transferiu-se, mantendo a mesma proporção, a cultura do primeiro repique para um tubo contendo volume maior de caldo MRS, e incubou-se sob as mesmas condições. Centrifugou-se a 6000 RPM (5934 x g) (Modelo: 5430R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 20 °C por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* com 14% (p/v) de água peptonada 0,1% (p/v).

2.2.3 Preparo das soluções de reagentes para formação das micropartículas

Soluções-mães de alginato de sódio a 4% (p/v) e cloreto de cálcio 4% (p/v) foram preparadas com água deionizada, mantidas sob agitação constante, posteriormente esterilizadas em autoclave a 121 °C. As soluções de ácido ascórbico (0,04% p/v) e hidrocloreto de L-cisteína (0,04% p/v) foram preparadas com vidrarias e água destilada estéreis, filtradas em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com diâmetro de 0,22 µm (Bonna-Agela, Delaware, EUA). *Lb. acidophilus* foi adicionado diretamente na solução biopolimérica bem como as soluções dos ingredientes supracitados.

2.2.4 Formação de micropartículas por gelificação iônica

Micropartículas de géis foram formadas a partir do gotejamento por extrusão das soluções biopoliméricas contendo o probiótico sobre uma solução aquosa de cloreto de cálcio (CaCl_2) a 4% (p/v) sob fraca agitação, que atuou como agente gelificante do biopolímero, conforme adaptação de Li et al. (2009); Silva et al. (2018). As soluções biopoliméricas foram gotejadas com auxílio de bomba peristáltica (*spray dryer*, modelo B-290 – Buchi, Valinhos, São Paulo, Brasil) com rotação de alimentação de 35 RPM (34 x g) e bico atomizador de um mini *spray dryer*, modelo B-290 (Buchi, Valinhos, São Paulo, Brasil). A altura entre a saída das gotas e o banho gelificante foi fixada em 20 cm de forma a obterem-se micropartículas esféricas. As micropartículas recém-formadas ficaram imersas na solução de CaCl_2 durante 30 min para completa gelificação. Após este período, as micropartículas foram coletadas por filtração através de papel de filtro quantitativo 18 cm de diâmetro (Qualy, Fortaleza, Ceará, Brasil) e armazenadas sob refrigeração a 4 ± 2 °C para serem analisadas.

2.2.5 Eficiência da microencapsulação

A eficiência do processo de produção de micropartículas foi realizada através da enumeração do micro-organismo na mistura biopolimérica antes e após atomização.

A eficiência da microencapsulação (EM) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Silva (2016) utilizando a Equação 1.

$$EM = \left(\frac{N}{N_0} \right) \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

N_0 é o número de células viáveis inicial (Log UFC/g) e N é o número de células viáveis nas micropartículas (Log UFC/g) após o processo de atomização e gelificação.

A enumeração na etapa da mistura biopolimérica foi realizada conforme descrito no item 2.2.6. A enumeração do probiótico na micropartícula foi realizada com 1 g de micropartículas que foi transferido para 10 mL de citrato de sódio (0,06 mol/ L) e submetido a agitação magnética (150 RPM – 148 x g) por 45 minutos a 37 °C em incubadora tipo *Shaker* com agitação orbital (Modelo Luca – 223, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil) para a liberação do micro-organismo da micropartícula. Seguiu-se, a partir de então, como descrito no item 2.2.6.

2.2.6 Caracterização morfológica das micropartículas por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após escolha da formulação de micropartículas a ser adicionada ao queijo tipo Reino, com base no percentual de sobrevivência do *Lb. acidophilus*, analisou-se a microestrutura das micropartículas úmidas através de microscópio óptico binocular com câmera digital acoplada (Quimis, Diadema, São Paulo, Brasil) com aumento de 400 vezes e 1000 vezes, seguindo metodologia adaptada de Etchepare et al. (2016).

A morfologia das micropartículas também foi analisada com microscópio eletrônico de varredura com detector eletrosecundário, Modelo LEO 1430 (Zeiss, Goettingen, Alemanha) a uma tensão de aceleração de 10 kV com a finalidade de verificar a aparência externa das micropartículas. A determinação com MEV necessitou da liofilização das micropartículas e sua disposição em papel adesivo de carbono bem como a cobertura com ouro 200 Å (ångström). A distância de trabalho foi de 10 mm conforme adaptado de Lian et al. (2002); Castro-Cislaghi et al. (2012).

2.2.7 Análise de tamanho e distribuição de micropartículas

O tamanho e a distribuição das micropartículas úmidas da formulação escolhida foram medidos em uma unidade de amostragem através da difração a laser, modelo PSA 1090 (0,02 – 500 µm) (CILAS, Orleães, França). Água destilada foi utilizada como meio de suspensão e foi adicionada uma quantidade de amostra para produzir um obscurecimento suficiente de 3 a 7%, conforme sugerido pelo fabricante (SOUZA et al., 2012).

2.3 PROCESSAMENTO DO QUEIJO TIPO REINO

O delineamento experimental utilizado para fabricação dos queijos tipo Reino envolveu elaboração de três formulações, sendo T1 denominada controle, pois continha apenas as culturas iniciadoras (0,26 g /10 L de leite), T2 e T3 contendo além das culturas iniciadoras, *Lb. acidophilus* (1% p/p) na forma livre e *Lb. acidophilus* microencapsulado (1% p/p), respectivamente. O processamento do queijo tipo Reino seguiu metodologia sugerida por Furtado (2008), Taveira (2013) e Taveira et al. (2015) com modificações, conforme descrito resumidamente a seguir.

O leite bovino foi pasteurizado, recebeu corante de urucum (0,12 mL/ L de leite) (Rica Nata, Piracema, Minas Gerais, Brasil), as culturas “starter” e cloreto de cálcio 40% (v/v) (Rica Nata, Piracema, Minas gerais, Brasil), respectivamente. Foi realizada uma incubação das

culturas lácticas a 32-34 °C/ 30 min. A formulação (T2) de queijo que continha *Lb. acidophilus* incorporado na forma livre incluiu a adição, na etapa de incubação, de 1% (p/p) de um inóculo de *Lb. acidophilus* obtido por concentração de células previamente reativadas conforme descrito em 2.2.2, a fim de atingir viabilidade aproximada de 10 Log UFC/ mL. O coagulante (Ha-la, Chr. Hansen, Valinhos, São Paulo, Brasil) foi então adicionado e a coagulação ocorreu (32-34 °C/ 30-35 min), seguida do corte da coalhada com auxílio de liras dispostas horizontal e verticalmente (grãos com 1,5 cm de aresta).

A primeira mexedura ocorreu de forma lenta por 12-15 minutos. A seguir removeu-se 30% (v/v) de soro em relação ao volume de leite, adicionou-se 20% (v/v) de água quente (40 °C) à coalhada, sob agitação contínua (correspondente à segunda mexedura), para aumentar a temperatura em 1 °C a cada 2 minutos, até atingir a temperatura de 40-43 °C (aproximadamente 12 minutos). Logo após a coalhada foi dessorada (dessoradora total).

A formulação de queijo que continha *Lb. acidophilus* incorporado na forma de micropartículas (T3) teve a adição de 1% (m/m) das mesmas após dessoradora total. A coalhada foi pré-prensada no tanque de fabricação por 20 minutos, então foi enformada e prensada em formas esféricas contendo cerca de 1 kg de coalhada, utilizando como carga o dobro do peso total na prensa por 20 horas. Após a desenformagem, os queijos foram salgados em salmoura a 20% (m/v) a 10-12 °C por 17 horas.

Os queijos foram desenformados após a salga, embalados a vácuo em embalagens plásticas, e colocados em câmara incubadora (Modelo EI: 08F1-H, Caltech, Recife, Pernambuco, Brasil) (12 ± 1 °C, 70% de umidade relativa do ar) por 10 dias, sendo virados diariamente. Os queijos foram então maturados por quinze dias em câmara (12 ± 1 °C, 55 – 65% de umidade relativa do ar) e, após este período, a embalagem foi retirada e a pintura foi realizada com corante natural de cochonilha (Docina Nutrição, Juiz de Fora – MG).

Os queijos foram mantidos sob refrigeração e analisados após um dia de fabricação e após 25 dias de maturação conforme descrito no item 2.4.

2.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DA MATÉRIA-PRIMA, MICROPARTÍCULAS E DAS FORMULAÇÕES DE QUEIJO TIPO REINO

Os parâmetros para análise de controle microbiológico para o leite bovino pasteurizado utilizado como matéria-prima, bem como os queijos fabricados foram coliformes a 35 °C (NMP/mL) (caldo Lauril Sulfato Triptose – Caldo LST – Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e coliformes a 45 °C (NMP/mL) (*Escherichia coli* – Caldo EC – Kasvi, São José dos

Pinhais, Paraná, Brasil); *Salmonella* spp./ 25mL ou g (ágar Bismuto Sulfito (BS) e Ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) – Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) incubados a 35-37 °C por 24 horas. Além disso, analisou-se *Staphylococcus* coagulase-positiva/g (ágar Baird-Parker – BP – Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) a 35 °C por 48 horas para os queijos e contagem padrão em placas de aeróbios mesófilos (Plate Count Agar – PCA – Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) a 30 °C por 48 horas para o leite pasteurizado conforme estabelecido pela American Public Health Association (APHA, 2001).

A enumeração de células viáveis de *Lb. acidophilus* para as micropartículas úmida foi realizada em profundidade, em ágar MRS, através de diluições decimais seriadas utilizando água peptonada 0,1% (p/v) como diluente. As placas foram incubadas a 37 °C por 72 horas sob condição de anaerobiose com auxílio de jarras de anaerobiose (Permutation, Curitiba – PR).

A avaliação da viabilidade dos lactobacilos presentes nas formulações de queijos tipo Reino, incluindo a cultura “starter” (LH-B02 – *Lb. helveticus*) e a cultura probiótica *Lb. acidophilus* foi realizada por enumeração em profundidade em ágar MRS (Merck, Rio de Janeiro – RJ), através de diluições decimais seriadas utilizando água peptonada 0,1% (p/v) como diluente, o qual é tradicionalmente empregado para enumerar *Lactobacillus* spp. termofílicos em anaerobiose a 37 °C por 72 h, e foi realizada após 1 e 25 dias de manutenção em câmara asséptica em condições já mencionadas. Sabe-se, através de testes preliminares, que a cultura R-704 composta por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, não atinge contagem superior a 4 Log UFC/ g nas mesmas condições de incubação da cultura probiótica e, portanto, não interferiu nas contagens dos lactobacilos.

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de enumeração dos lactobacilos obtidos foram expressos como média seguida do desvio padrão. Aplicou-se análise de variância (ANOVA) seguida da comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), para definir a melhor formulação de micropartículas baseada na maior porcentagem de sobrevivência de *Lb. acidophilus* obtida.

Aplicou-se análise de variância (ANOVA) seguida da comparação de médias pelo teste de Tukey, para definir diferenças significativas entre as formulações ao longo da maturação ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para análise dos resultados físico-químicos ao longo da maturação, bem como a análise de perfil de textura.

Aplicou-se análise de variância (ANOVA) seguida da comparação de médias pelo teste de Dunnett, para definir diferenças significativas de T2 e T3 com relação ao controle (T1) ao

nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para análise dos resultados da análise físico-química no tempo 1 e 25.

Utilizou-se o programa GRAPHPAD prisma, versão 6.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 EFICIÊNCIA DO PROCESSO DE ENCAPSULAÇÃO

Os valores da eficiência da microencapsulação foram $88,15 \pm 0,52\%$, $85,69 \pm 1,40$, $85,93 \pm 1,13$ e $82,82 \pm 1,81\%$, para F1, F2, F3 e F4, respectivamente. Não houve diferença significativa entre as formulações, exceto entre F1 e F4 ($p < 0,05$).

A eficiência pode ser influenciada por diferentes fatores. Assim, quanto mais próxima a distância entre o bico atomizador e a solução de cloreto de cálcio, maior a perda do agente a ser encapsulado (ANAL et al., 2003; ANAL; STEVENS, 2005). Silva et al. (2018) relataram recentemente uma eficiência de encapsulação de *Lb. acidophilus* por extrusão seguida de gelificação iônica bastante superior (98%), porém a distância entre o bico atomizador e a solução de cloreto de cálcio foi de 30 cm, 10 cm a mais do que a distância empregada no presente estudo. Além disso, Gebara et al. (2013) afirmam que altos valores de eficiência do processo podem ser devidos, possivelmente, a resistência natural do micro-organismo frente ao processo bem como a não utilização de solventes orgânicos e temperatura elevadas.

O alginato, empregado como material de parede, possui estrutura porosa, pode facilitar a liberação do agente encapsulado, resultando em sua maior exposição e redução da proteção (CHEN et al., 2005; ETCHEPARE et al., 2016), e pode também ser um fator responsável pelos valores de eficiência encontrados. Todavia, outros pesquisadores utilizaram alginato e reportaram eficiências de encapsulação semelhantes a esta pesquisa. Corbo; Bevilacqua; Sinigaglia (2011) obtiveram valor de eficiência de 83%, utilizando a mesma técnica para produção de géis de alginato de *Lb. rhamnosus*. Gebara et al. (2013) avaliaram micropartículas contendo *Lb. acidophilus* utilizando pectina como material de parede associada com proteína do soro do leite e obtiveram eficiência de 84,35%.

Cabe destacar que a adição dos ingredientes (hidrocloro de L-cisteína, ácido ascórbico) às micropartículas não está relacionada à eficiência da microencapsulação, a qual pode estar ligada a perdas de células microbianas devido à difusão, pois o alginato forma um material de parede com porosidade relativamente alta, conforme já comentado anteriormente.

Esses ingredientes foram adicionados em concentrações muito baixas além de não interferirem na porosidade das micropartículas.

4.2 VIABILIDADE DO PROBIÓTICO NAS MICROPARTÍCULAS ELABORADAS

A viabilidade do probiótico nas micropartículas, expressa em porcentagem de sobrevivência (Figura 1), diferiu significativamente ($p < 0,05$) durante a vida de prateleira para todas as formulações quando comparada com o tempo 0 dias, exceto para F2 que não diferiu nos tempos 20 e 30 dias. Cabe destacar que a formulação contendo apenas alginato (F1) não favoreceu a manutenção da viabilidade do micro-organismo, uma vez que houve uma redução significativa de cerca de 2,09 ciclos logarítmicos ($p < 0,05$) ($26,39 \pm 0,62\%$) após 20 dias e de 4,2 ciclos logarítmicos ($53,79 \pm 0,17\%$) após 30 dias quando comparadas com tempo 0, não permanecendo viável no tempo 60 dias. Comportamento similar foi observado em F2, com perda de 2,94 ciclos logarítmicos ($33,31 \pm 0,19\%$) após 30 dias de armazenamento.

As formulações F3 e F4 também apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de sobrevivência do probiótico ao longo do armazenamento, porém atingiram porcentagens superiores a F1 e F2 após 30 dias de armazenamento, sendo $75,91 \pm 0,25\%$ e $80,32 \pm 0,55\%$, respectivamente para F3 e F4. A formulação contendo ácido ascórbico (F3) ainda apresentou sobrevivência de $33 \pm 0,16\%$ mesmo após 60 dias. Ao tempo 20, apenas F3 e F4 não diferiram entre si ($p > 0,05$), entretanto com 30 dias, observou-se que todas as formulações diferiram entre si ($p < 0,05$), sendo F4, a formulação que apresentou maior percentual de sobrevivência ($80,32 \pm 0,55\%$).

Ácido ascórbico adicionado em produtos lácteos, como iogurte probiótico, auxiliou na manutenção das bactérias lácticas devido à redução da concentração de oxigênio dissolvido, diminuindo conseqüentemente o potencial de oxirredução (DAVE, SHAH, 1997; TALWALKAR, KAILASAPATHY, 2004).

A incorporação de substâncias como hidrócloro de L-cisteína e ácido ascórbico também pode favorecer a sobrevivência de bactérias lácticas como *Lb. acidophilus* (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001), semelhantemente aos resultados desta pesquisa, demonstrando, assim, que são alternativas para reduzir a perda de viabilidade do probiótico nas micropartículas produzidas, particularmente naquelas onde o ácido ascórbico foi adicionado isoladamente (F3) ou combinado à L-cisteína (F4).

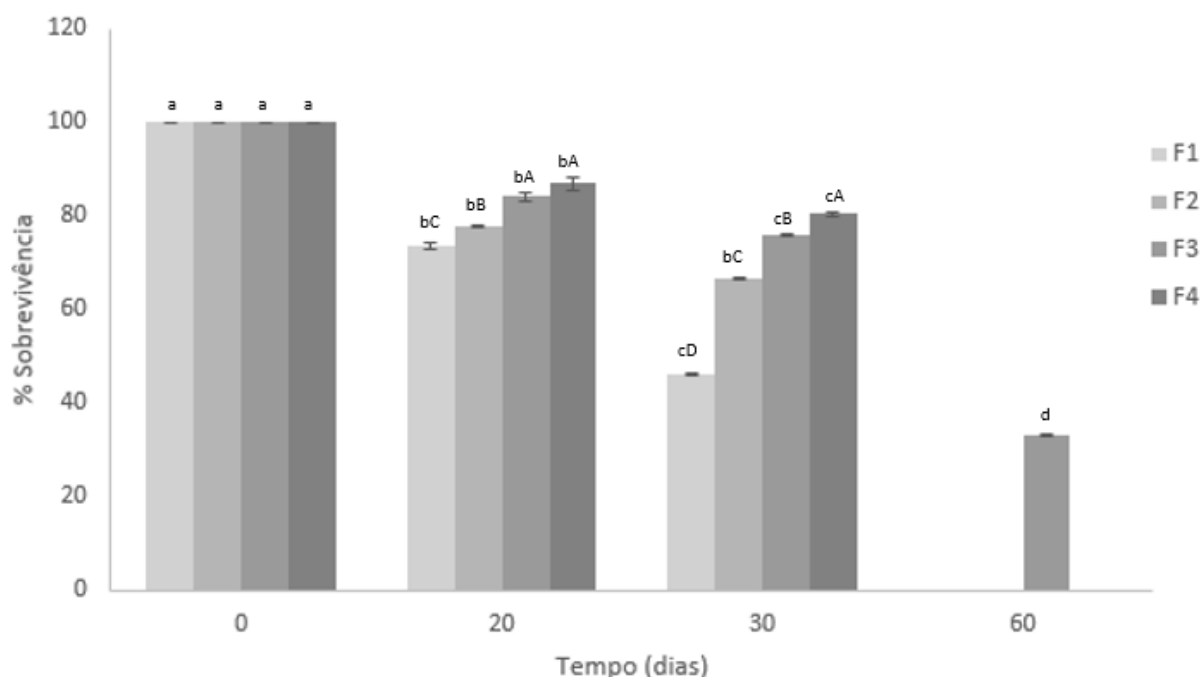


Figura 1 – Porcentual de sobrevivência de *Lb. acidophilus* (LA-3) nas diferentes formulações de micropartículas mantidas sob refrigeração (4 ± 2 °C) ao longo de 60 dias. ^{a-d} Médias seguidas por diferentes letras minúsculas diferem estatisticamente para a mesma formulação ao longo do tempo (teste de Tukey, $p < 0,05$). ^{A-D} Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas diferem estatisticamente entre as formulações para cada tempo (teste de Tukey, $p < 0,05$); F1 (Alginato puro); F2 (Alginato + L-Cisteína); F3 (Alginato + Ác. Ascórbico); F4 (Alginato + L-Cisteína + Ác. Ascórbico).

Resumidamente, os resultados das porcentagens de sobrevivência do micro-organismo encapsulado durante os 60 dias de estocagem a 4 ± 2 °C permitem destacar as formulações F3 e F4, cujos resultados atingiram pelo menos $75,91 \pm 0,25\%$ de sobrevivência após 30 dias de estocagem, bastante superiores a F1 (45,91% de sobrevivência). Tal fato evidencia ação favorável dos ingredientes utilizados nas micropartículas na sobrevivência de *Lb. acidophilus*.

Adicionalmente, as partículas F3 ($6,65 \pm 0,04$ Log UFC/g) e F4 ($6,84 \pm 0,08$ Log UFC/g) apresentaram viabilidades similares da reportada por Silva et al. (2018) ($6,68 \pm 0,21$ Log UFC/g) em micropartículas de alginato adicionado de fruto-oligossacarídeo após processo de atomização (tempo 0) e maior que Etchepare et al. (2016), cuja viabilidade das micropartículas úmidas de alginato de sódio foi de $6,48 \pm 0,08$ Log UFC/g, após 30 dias de estocagem sob refrigeração (7 °C). Portanto, as micropartículas dessas formulações tornam-se alternativas viáveis para aplicação no alimento.

Considerando-se os resultados de viabilidade do probiótico nas micropartículas expresso pelo porcentual de sobrevivência durante a vida de prateleira conjuntamente à eficiência (EM), a formulação F3, a qual continha 0,04% de ácido ascórbico, foi escolhida para

a continuidade das análises quanto a morfologia; distribuição e tamanho das micropartículas. Finalmente, as micropartículas da mesma formulação foram aplicadas na matriz alimentar de interesse, isto é, pela incorporação ao queijo tipo Reino.

4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS MICROPARTÍCULAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA (MO) E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As imagens de microscopia óptica (MO) bem como de MEV (Figuras 2 e 3, respectivamente) exibem a morfologia das micropartículas de géis produzidos com alginato como material de parede associado ao ácido ascórbico. Foi possível observar micropartículas com formato esférico e superfície uniforme e lisa (Figura 2). As células de *Lb. acidophilus* em forma de bastonete distribuídas na matriz encapsulante são facilmente visualizadas (Figura 3a).

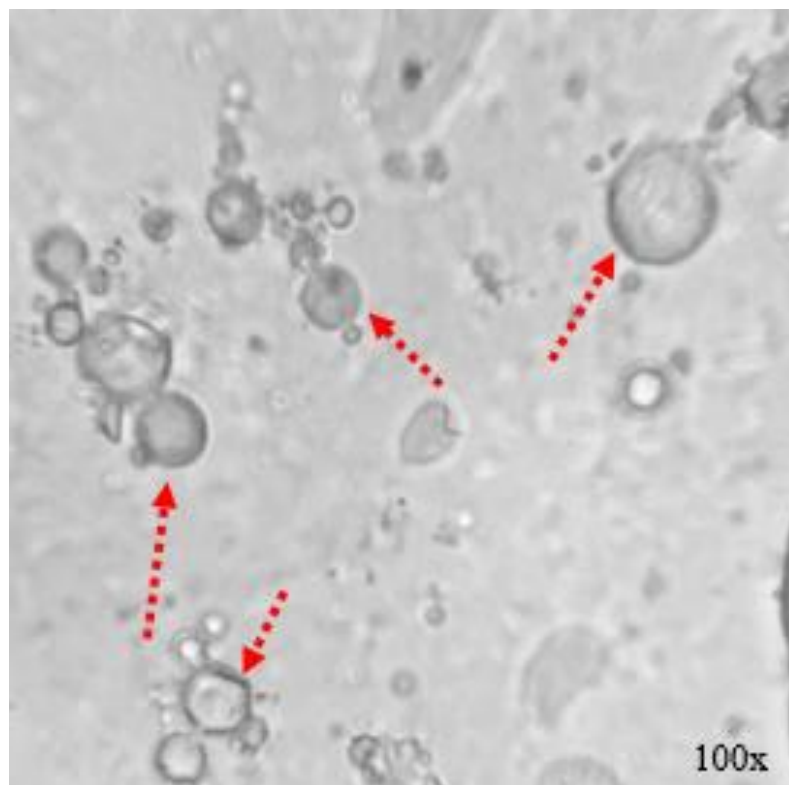


Figura 2 – Microscopia óptica das micropartículas atomizadas via *spray dryer* (F3: Alginato + probiótico + Ác. Ascórbico). Setas vermelhas indicam as micropartículas produzidas.

Além disso, evidencia-se que as micropartículas não apresentaram poros ou rachaduras nítidas, sendo caracterizadas como tipo matriz, conforme define Zuidam; Shimoni (2010), nas

quais o agente encapsulado se encontra disperso no material de parede, aparecendo distribuído homogeneamente na micropartícula, conseqüentemente estando presente tanto na parte interna quanto na superfície. Resultado semelhante foi encontrado por Etchepare et al. (2016) que avaliaram micropartículas de alginato puro e alginato com amido e quitosana contendo *Lb. acidophilus*, relatando micropartículas do tipo matriz com a presença do micro-organismo distribuído uniformemente.

Houve a formação de uma rede coesa com alta densidade de micropartículas (Figura 3) devido possivelmente ao preparo da amostra, uma vez que a análise de microscopia eletrônica de varredura necessitou da secagem das micropartículas através do processo de liofilização, afetando-as diretamente. A liofilização provoca formação de cristais de gelo sob baixa pressão a baixas temperaturas, resultando em micropartículas secas, porém com porosidade relativamente alta (DOLLY et al., 2011).

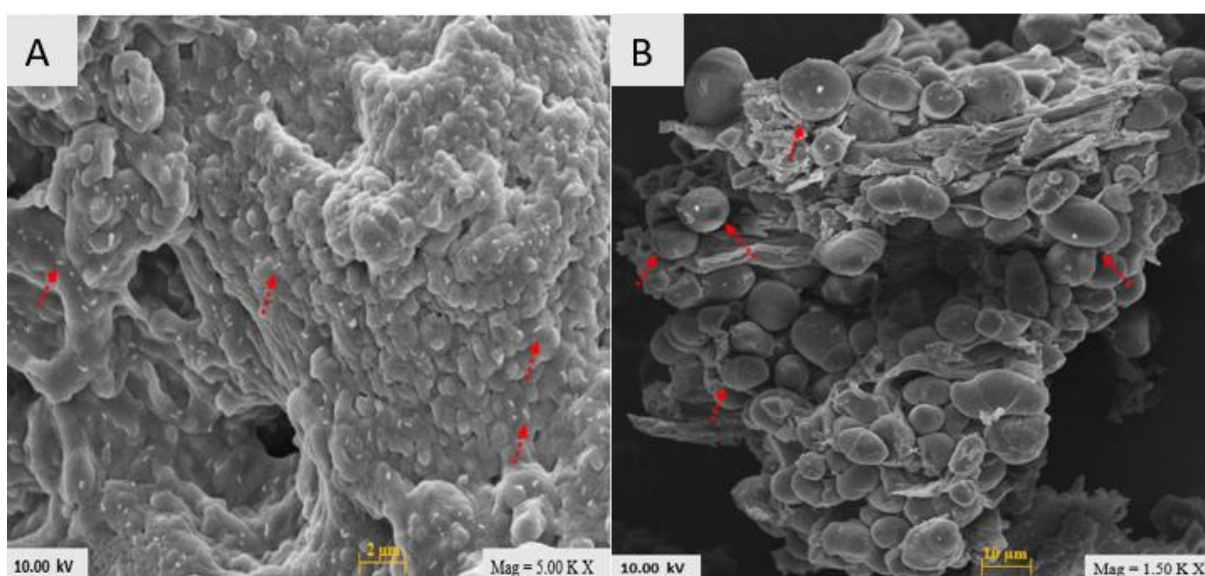


Figura 3 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das micropartículas da formulação F3: Alginato + probiótico + Ác. Ascórbico. (A) Aumento de 5000 vezes. Setas vermelhas indicam o micro-organismo; (B) Aumento de 1500 vezes. Setas vermelhas indicam as partículas produzidas.

4.4 DIÂMETRO MÉDIO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE MICROPARTÍCULA

Vários fatores afetam diretamente o diâmetro médio das micropartículas, como exemplos a velocidade de alimentação do processo e a distância do bico atomizador até a solução de cloreto de cálcio (TONON et al., 2009). Além disso, tensão superficial, queda de pressão através do bico e composição da mistura biopolimérica também interferem (ZUIDAM; SHIMONI, 2010; SANDOVAL-CASTILLA et al., 2010).

A Figura 4 apresenta o histograma de distribuição de tamanho de micropartículas (μm), no qual o diâmetro médio das micropartículas produzidas foi de $58,01 \pm 1,51 \mu\text{m}$. Etchepare (2014) já tinha afirmado, a partir de seu estudo com micropartículas de *Lb. acidophilus* obtidas por gelificação iônica, que quanto maior a distância entre o bico atomizador e a solução de gelificante, menor o tamanho de micropartícula nas condições por ele estudada. O mesmo autor (ETCHEPARE et al., 2016) relatou ter obtido diâmetro médio de $55,13 \mu\text{m}$ em micropartículas úmidas de alginato puro empregando uma distância de 30 cm do bico atomizador e solução de cloreto de cálcio.

Sacchetin et al. (2010) afirmaram que o tamanho das micropartículas também está relacionado como a concentração e viscosidade da solução biopolimérica. Assim, quanto menor for a concentração e a viscosidade, menores serão os diâmetros atingidos. Holkem (2016) consideraram que alginato a 1,5% foi a melhor concentração da solução biopolimérica dentre as estudadas, garantindo diretamente a eficácia do processamento e a obtenção de micropartículas contendo BB-12 através da técnica de emulsão/gelificação com $58,81 \mu\text{m}$ de diâmetro médio. Esses resultados concordam com o presente estudo, uma vez que se apresentou diâmetro médio similar ($58,01 \pm 1,51 \mu\text{m}$) utilizando mesma concentração de alginato.

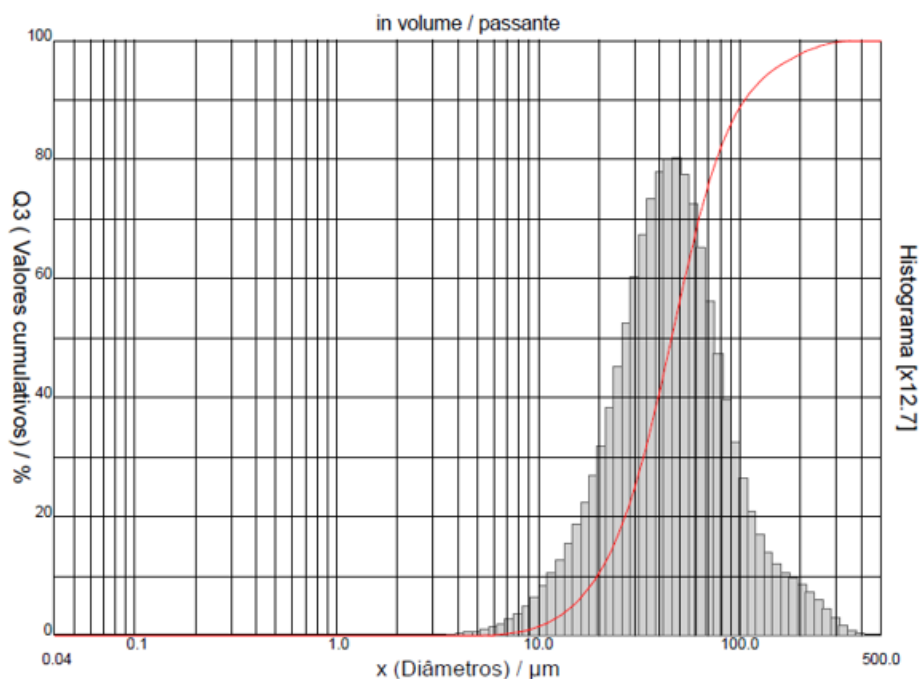


Figura 4 – Histograma de distribuição de partículas da formulação F3: Alginato + probiótico + Ác. Ascórbico.

Portanto, diâmetro médio de 58,81 μm obtido neste estudo permite considerar que esteja adequado para introdução no queijo Reino sem alterações sensoriais significativas, visto que Rodrigues; Moraes; Silva (2012) afirmam que micropartículas com tamanhos menores que 100 μm são desejáveis para aplicação em alimentos, pois muito provavelmente não serão perceptíveis sensorialmente.

4.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DA MATÉRIA-PRIMA E QUEIJO TIPO REINO

As análises microbiológicas da matéria-prima (leite bovino) e dos queijos elaborados mostraram-se dentro dos padrões estabelecidos para o leite e queijos de média umidade (APHA, 2001), pois apresentaram contagens inferiores a 3 NMP/ mL tanto para coliformes totais quanto para coliformes termotolerantes, bem como ausência de *Salmonella* spp. e de *Staphylococcus aureus* coagulase-positiva tanto para o leite quanto para os queijos, além de contagem abaixo de 10^3 UFC/ mL para aeróbios mesófilos no leite, caracterizando-os como próprios ao consumo.

Comparando-se as contagens de *Lactobacillus* spp. totais nos queijos T2 e T1 após 1 dia de fabricação, observou-se um aumento significativo de 0,31 Log UFC/g ($p < 0,05$), resultado esperado em função da adição de *Lb. acidophilus* na forma livre. O aumento não expressivo nas contagens pode ser explicado por fatores que possivelmente influenciaram a multiplicação de *Lb. acidophilus* em T2, como exemplo condições aeróbias, presença de substâncias inibitórias potencialmente sintetizadas pelas culturas iniciadoras, bem como competição entre os microorganismos (ABADÍA-GARCÍA et al., 2013; SILVA, 2016). A formulação contendo o *Lb. acidophilus* microencapsulado (T3) apresentou aumento de cerca de 1,46 Log UFC/ g de *Lactobacillus* spp. em relação a T1. Assim, a incorporação das micropartículas permitiu um aumento significativo ($p < 0,05$) nas contagens de lactobacilos totais.

Tabela 1 – Contagem de *Lactobacillus* spp. após 1 dia, 25 dias de maturação e na porção recomendada para consumo (30 g) de queijo tipo Reino.

Formulações	1 dia (Log UFC/g)	25 dias (Log UFC/g)	25 dias (Log UFC/ 30g)
T1	7,88 \pm 0,04 ^{aA}	7,97 \pm 0,03 ^{aA}	9,45 \pm 0,03 ^A
T2	8,19 \pm 0,02 ^{aB}	7,34 \pm 0,05 ^{bB}	8,82 \pm 0,05 ^B
T3	9,34 \pm 0,02 ^{aB}	8,49 \pm 0,08 ^{bB}	9,96 \pm 0,08 ^B

Fonte: Próprio autor. ^{a-d} Médias seguidas por diferentes letras minúsculas diferem estatisticamente para a mesma formulação ao longo do tempo (teste de Tukey, $p < 0,05$). ^{A-D} Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas diferem estatisticamente do controle para cada tempo (teste de Dunnett, $p < 0,05$): T1 (Formulação Controle); T2

(Formulação adicionada de *Lb. acidophilus* livre); T3 (Formulação adicionada de *Lb. acidophilus* microencapsulado).

A formulação T2 ($7,34 \pm 0,05$ Log UFC/ g) apresentou decréscimo significativo ($p < 0,05$) de cerca de $0,63$ Log UFC/ g em relação a T1 após 25 dias. Entretanto, ao se comparar o queijo tipo Reino adicionado de micropartículas (T3) com o controle (T1), pode-se observar um aumento $0,52$ Log UFC/ g, o que confirma a maior viabilidade de lactobacilos totais do produto pronto para a comercialização acima de 8 Log UFC/ g na formulação T3.

Empregou-se a contagem de *Lactobacillus* spp. devido à não seletividade do meio de cultura MRS para contagem separadamente do probiótico *Lb. acidophilus*. Assim, *Lb. helveticus* (cultura iniciadora) também se multiplicou nesse meio. Apesar disso, pode-se alegar a potencialidade funcional, uma vez que o *Lb. acidophilus* é considerado probiótico (BRASIL, 2008) e vários são os estudos que relatam a atuação do *Lb. helveticus* de forma benéfica ao organismo humano, produzindo peptídeos bioativos com função anti-hipertensiva, imunomoduladora e redução de pressão arterial (HAYES et al., 2007; GOBBETTI et al., 2010; LEBLANC et al., 2002; LECLERC et al., 2002).

Semelhantemente ao reportado neste estudo sobre a viabilidade do probiótico na forma livre (T2) no primeiro dia de fabricação, Chaves; Gigante (2016) ao estudar queijo Prato adicionado do probiótico *Lactobacillus acidophilus* (La-5) na forma livre, observou viabilidade de cerca de 8 Log UFC/g de queijo. Entretanto, a redução de cerca de $0,38$ Log UFC/ g de queijo após 28 dias de estocagem sob temperatura de refrigeração, foi inferior à reportada para T2 ($0,87 \pm 0,02$ Log UFC/ g). Da mesma forma, Ribeiro et al. (2014) ao avaliar a viabilidade de La-5 em iogurtes potencialmente probióticos, relataram viabilidade de cerca de $8,18 \pm 0,03$ Log UFC/ g de iogurte após 1 dia de fabricação. Em conformidade aos resultados deste estudo, também pode-se perceber redução significativa na viabilidade probiótica após 28 dias de estocagem em refrigeração ($p < 0,05$), porém em menor intensidade ($0,43 \pm 0,03$ Log UFC/ g do produto).

Considerando a formulação adicionada de micropartículas (T3), Garcia-Ceja et al. (2015) observaram resultado de viabilidade inicial superior a T3, sendo de cerca de 10^9 UFC/ g para leite e iogurte com adição de geleia de amora e partículas de alginato de sódio contendo *Lb. acidophilus* após 1 dia de fabricação. Contudo, depois de 25 dias de estocagem (5°C), foi possível identificar redução significativa ($p < 0,05$) na viabilidade atingindo 10^7 UFC/ g, valor inferior ao observado para T3 no mesmo período de armazenamento. Os autores justificaram a redução significativa em função do meio ácido dos alimentos nos quais estavam imersas as partículas de alginato, pois pode ocorrer dano parcial na partícula devido à ruptura nas ligações

alginate-cálcio que comprometem sua estabilidade (GÅSERØD; SANNES; SKJÅK-BRÆK, 1999; GARCIA-CEJA et al., 2015). Nesse contexto, o queijo tipo Reino possibilita um ambiente menos ácido (pH 5,2 – 5,50), favorecendo a estabilidade das micropartículas.

Ainda, de acordo com Tenório (2012), a viabilidade de La-5 na forma microencapsulada com pectina em queijo Prato foi significativamente inferior (5,63 e 5,44 Log UFC/ g após 1 e 30 dias fabricação, respectivamente) ao reportado para T3 após 25 dias de fabricação ($8,49 \pm 0,08$ Log UFC/ g). O autor ainda afirma que este tipo de micropartícula não produziu efeito protetor ao micro-organismo e também justifica a baixa contagem por possíveis perdas das partículas durante o processamento do produto.

Considerando que a porção recomendada para consumo de queijos é de 30 g (BRASIL, 2003), é importante destacar que todas as formulações elaboradas nesta pesquisa obtiveram contagens acima de 8 ciclos logarítmicos de lactobacilos totais, destacando a formulação (T3), a qual foi adicionada de probióticos nas micropartículas atingindo cerca de 9,96 Log UFC/ 30 g. Diante do exposto, pode-se destacar que os queijos (T1 e T3) estão em conformidade com consenso internacional para alegação de produtos potencialmente probióticos ao serem comparados com legislação canadense e italiana, que estabelecem 1×10^9 UFC por porção e 1×10^9 UFC por ingestão diária, respectivamente (HILL et al., 2014).

Ademais, é clara a potencialidade do emprego de *Lb. acidophilus* através de micropartículas no queijo tipo Reino quando se considera sua manutenção e/ ou provável incremento na proteção do probiótico dentro da matriz do queijo durante sua vida de prateleira e futuro consumo, caracterizando o alimento com potencialidade funcional.

5 CONCLUSÃO

A micropartícula que continha alginato aditivado com ácido ascórbico (F3) apresentou melhores resultados quanto ao percentual de sobrevivência do probiótico durante a vida de prateleira associado com a eficiência do processo de microencapsulação. Apresentou características morfológicas e diâmetro médio que favoreceu sua incorporação ao queijo tipo Reino.

A adição de *Lb. acidophilus* através de micropartículas contendo ácido ascórbico ao queijo tipo Reino foi favorável, visto que após o período de maturação a formulação que o continha permaneceu com contagem acima de 8 Log UFC/ g de lactobacilos totais, demonstrando a proteção do micro-organismo durante o período de 25 dias. Portanto, a adição

de micropartículas contendo o probiótico *Lb. acidophilus* em uma formulação de queijo Reino forneceu a características de alimento com potencial funcional.

REFERÊNCIAS

- ABADÍA-GARCÍA, L.; CARDADOR, A.; CAMPO, S. T. M. DEL.; ARVÍZU, S. M.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; REGALADO-GONZÁLEZ, C.; GARCÍA-ALMENDAREZ, B.; AMAYA-LLANO, S. L. Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. **International Dairy Journal**, v. 33, p. 191-197, 2013.
- ANAL, A. K.; BHOPATKAR, D.; TOKURA, S.; TAMURA, H.; STEVENS, W. F. Chitosan-alginate multilayer beads for gastric passage and controlled intestinal release of protein. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 29, p. 713-724, 2003.
- ANAL, A. K.; STEVENS, W. F. Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 290, n. 1-2, p. 45-54, 2005.
- ANDREATA, E.; FERNANDES, A. M.; SANTOS, M. V. DOS.; LIMA, C. G. DE.; MUSSARELLI, C.; MARQUES, M. C.; OLIVEIRA, C. A. F. Effects of milk somatic cell count on physical and chemical characteristics of mozzarella cheese. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 62, n.3, p. 166-170, 2007.
- APHA. American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington, 2001.
- BEZERRA, T. K. A. **Estudo da proteólise, lipólise e compostos voláteis em queijo de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas**. 2015. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2015.
- BRASIL. (2008). Agência Nacional de Vigilância Sanitária e 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. (National Health Surveillance Agency - ANVISA. Foods with functional and or health claims, new foods/ingredients, bioactive compounds and probiotics: list of approved functional property claims.).
- BRASIL. (2003). 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: Brasília, Distrito Federal, em 26 de dezembro de 2003. (National Health Surveillance Agency - ANVISA. Resolution RDC No. 359 of 23 December 2003. Regulation of Packaged Food Portions for Nutritional Labelling. Official Gazette: Brasilia, Federal District, December 26, 2003).
- BURITI, F. C.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in symbiotic guava mousses and its survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 121-129, 2010.
- BURITI, F. C.; ROCHA, J. S. DA.; ASSIS, E. G.; SAAD, S. M. I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its applications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1279-1288, 2005b.
- 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 symbiotic *petit-suisse* cheese. **LWT –Food Science and Technology**, v. 41, p. 1037-1046, 2007.

- CASTRO-CISLAGHI, F. P. DE.; SILVA, C. DOS. R. E.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; LOREZ, J. G.; SANT'ANNA, E. S. Bifidobacterium Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food engineering**, v. 113, p. 186-193, 2012.
- CENCIC, A.; CHINGWARU, W. The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health. **Nutrients**, v. 2, n. 6, p. 611-625, 2010.
- CHAVES, K. S., GIGANTE, M. L. Prato cheese as suitable carrier for *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium* Bb12. **International Dairy Journal**, v. 52, p. 10-18, 2016.
- CHEN, K. N.; CHEN, M. J.; LIU, J. R.; LIN, C. W.; CHIU, H. Y. Optimization of Incorporated Prebiotics as Coating Materials for Probiotic Microencapsulation. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 5, p. 260-266, 2005.
- CORBO, M. R.; BEVILACQUA, A.; SINIGAGLIA, M. Shelf life of alginate beads containing lactobacilli and bifidobacteria: characterisation of microspheres containing *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **International journal of Food Science & Technology**, v. 46, p. 2212-2217, 2011.
- CRUZ, A.; BURITI, F. C. A.; De SOUZA, C. H. B.; FARIA, J. A. F.; SAAD, S. M. I. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 8, p. 344-354, 2009.
- DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Effect of cysteine on the viability of yogurt and probiotic bacteria in yogurts made with commercial starter cultures. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 537-545, 1997a.
- DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Effect of the level of starter culture on viability of yoghurt and probiotic bacteria in yogurts. **Food Australia.**, v. 49, p. 164-168, 1997b.
- DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 435 – 443, 1997c.
- DOLLY, P.; ANISHAPARVIN, A.; JOSEPH, G. S.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) by spray-freeze drying method and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 6, p. 568-574, 2011.
- ETCHEPARE, M. A. **Produção, caracterização e viabilidade de micropartículas com *Lactobacillus acidophilus* obtidas por gelificação iônica**. 2014. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2014.
- ETCHEPARE, M. A.; RADDATZ, G. C.; FLORES, E. M. M.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, G. C.; BARIN, J. S.; GROSSO, C. R. F.; MENEZES, C. R. Effect of resistance starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. **LWT- Food Science and Technology**, v. 65, p. 511-517, 2016.
- FURTADO, M. M. **Queijo com olhaduras**. 1 ed. São Paulo: Fonte Comunicações, p. 179, 2007.
- GARCÍA-CEJA, A.; MANI-LÓPEZ, E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined lactobacilli encapsulated in alginate or alginate-chitosan. **LWT – Food Science and Technology**, v. 63, p. 482-489, 2015.
- GÅSERØD, O.; SANNES, A.; SKJÅK-BRÆK, G. Microcapsules of alginate-chitosan. II. A study of capsule stability and permeability. **Biomaterials**, v. 20, p. 773-783, 1999.
- GEBARA, C.; CHAVES, K. S.; RIBEIRO, M. C. E.; SOUZA, F. N.; GROSSO, C. R. F.; GIGANTE, M. L. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein

- microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 51, p. 872-878, 2013.
- GEBARA, C.; RIBEIRO, M. C. E.; CHAVES, K. S.; GANDARA, A. L. N.; GIGANTE, M. L. Effectiveness of different methodologies for the selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* La5 from yoghurt and Prato cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p. 508-513, 2015.
- GOBBETTI, M.; STEPANIAK, L.; DE ANGELIS, M.; CORSETTI, A.; DI CAGNO, R. Functional microorganism for functional food quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, p. 716-727, 2010.
- GONZÁLEZ-OLIVARES, L. G.; LÓPEZ-CUELLAR, Z. L.; AÑORVE-MORGA, J.; FRANCO-FERNANDÉZ, M. J.; CASTÑEDA-OVANDO, A.; CONTRERAS-LÓPEZ, E.; JAIMEZ-ORDAZ, J.; RODRIGUEZ-SERRANO, G. M. Viability and Proteolytic Capacity of *Lactobacillus bulgaricus* 2772 and *Lactobacillus rhamnosus* GG during Cheese Ripening. **Journal of Biosciences and Medicine**, v. 2, p. 7-12, 2014.
- HAYES, M.; COAKLEY, M. E.; O'SULLIVAN, L.; STANTON, C.; HILL, C.; FITZGERALD, G. F.; MURPHY, J. J.; ROSS, R. P. Cheese as a delivery vehicle for probiotic and biogenic substances. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 61, p. 132-141, 2006.
- GARCÍA-CEJA, A., MANI-LÓPEZ, E., PALOU, E., LÓPEZ-MALO, A. Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined *lactobacilli* encapsulated in alginate or alginate-chitosan. **Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 482-489, 2015.
- HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, p. 506-514, 2014.
- HOLKEM, A. T. **Microencapsulação de *Bifidobacterium BB-12* por gelificação iônica interna: estudo da produção, caracterização e viabilidade**. 2016. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2016.
- IDF – FERMENTED and NON-FERMENTED MILK PRODUCTS –: Detection and Enumeration of *Lactobacillus acidophilus*: culture media. In: **Bulletin of International Dairy Federation**, Brussels n. 306, p.23, 1995.
- KENT, R. M.; DOHERTY, S. B. Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. **Food Research International**, v. 63, p. 102-705, 2014.
- KIM, S. J.; CHO, S. Y.; KIM, S. H.; SONG, O. J.; SHIN, I. S.; CHA, D. S.; PARK, H. J. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 493-500, 2008.
- LEBLANC, J. G.; MATAR, C.; VALDÉZ, J. C.; LEBLANC, J.; PERDIGON, G. Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. **Journal Dairy Science**, v. 85, p. 2733-2742, 2002.
- LECLERC, P. L.; GAUTHIER, S. F.; BACHELARD, H.; SANTURE, M.; ROY, D. Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. **International Dairy Journal**, v. 12, 995-1004, 2002.
- LIAN, W. C.; HSIAO, H. C.; CHOU, C. C. Survival of bifidobacteria after spray-drying. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 79-86, 2002.

- LI, X. Y.; CHEN, X. G.; CHA, D. S.; PARK, H. J.; LIU, C. S. Microencapsulation of probiotic bacteria with alginate-gelatin and its properties. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, n. 4, p. 315-324, 2009.
- LI, X. Y.; CHEN, X. G.; SUN, Z. W.; PARK, H. J.; CHA, D. S. Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1479-1485, 2011.
- LIMA, J. R.; LOCATELLI, G. O.; FINKLER, L.; LUNA-FINKLER, C. L. Incorporação de *Lactobacillus casei* microencapsulado em queijo tipo coalho. **Revista Ciência & Saúde**, v. 7, n. 1, p. 27-34, 2014.
- NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; NICOLAUS, B.; POLI, A.; ORLANDO, P. The prebiotic source influences the growth, biochemical features and survival under simulated gastrointestinal conditions of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **Anaerobe**, v. 18, p. 280-285, 2012.
- LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 1-17, 2001.
- PANDEY, K. R.; NAIK, S. R.; VAKIL, B. V. Probiotics, prebiotics and symbiotics - a review. **Journal Food Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 7577-7587, 2015.
- RAJAM, R.; KARTHIK, P.; PARTHASARATHI, S.; JOSEPH, G. S.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Effect of whey protein-alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, v. 4, p. 891-898, 2012.
- RIBEIRO, M. C. E.; CHAVES, K. S.; GEBARA, C.; INFANTE, F. N. S.; GROSSO, C. R. F.; GIGANTE, M. L.; Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. **Food Research International**, v. 66, p. 424-431, 2014.
- RODRIGUES, L. M.; MORAES, T.; SILVA, R. da **Liberção de anti-inflamatórios e Vitamina C a partir de microesferas de hidrogéis de albumina e colágeno**. In: IV SIMTEA - Simpósio de Tecnologia e Engenharia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão: SIMTEA, 2012.
- SACCHETIN, P. S. C.; MORAES, A. M.; LEAL, C. A. G.; FIQUEIREDO, H. C. P. Produção de micropartículas de alginato contendo *Flavobacterium columnare* inativada pelo método de emulsão para vacinação de peixes por via oral. **Química nova**, v. 33, n. 2, p. 263-268, 2010.
- SALLANS, F.; RODRIGUEZ, F.; SABLAYROLLES, B.; COMBES, A.; PATAU, J. P.; ROUFFIAC, R. Étude comparative de cinq spécialités de théophylline a lebération prolongée. **Journal Pharmacie Belgique**, Bruxelles, v. 2, n. 43, p. 81-87, 1998.
- SANTIESTEBAN-LÓPEZ, A.; LÓPEZ-MALO, A.; GÓMEZ-DÍAZ, J. J.; PÉREZ-ARMENDÁRIZ, B. Effect of L-cysteine and ascorbic acid on the propagation of *Lactobacillus casei* in milk. **International Research Journal of Microbiology**, v. 4, p. 113-118, 2013.
- SANDOVAL-CASTILLA, O.; LOBATO-CALLEROS, C.; GARCÍA-GALINDO, H. S.; ALVAREZ-RAMÍREZ, J.; VERNON-CARTER, E. J. Textural properties of alginate-pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 111-117, 2010.
- SILVA, K. C. G. **Produção de microgéis simbióticos de gelatina-alginato e simulação da liberação controlada em condições gastrointestinais**. 2016. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2016.

- SILVA, K. C. G.; CEZARINO, E. C.; MICHELON, M.; SATO, A. C. K. Symbiotic microencapsulation to enhance *Lactobacillus acidophilus* survival. **LWT – Food Science and Technology**, v. 89, p. 503-509, 2018.
- SOUZA, F.; GEBARA, C.; RIBEIRO, M. C. E.; CHAVES, K. S.; GIGANTE, M. L.; GROSSO, C. R. F. Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins. **Food Research International**, v. 49, p. 560-566, 2012.
- TALWALKAR, A.; KAILASAPATHY, K. The Role of Oxygen in the Viability of Probiotic Bacteria with Reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 5, p. 1-8, 2004.
- TAVEIRA, L. B. **Aspectos Físico-químicos e Sensoriais do Queijo do Reino maturado sob Diferentes Concentrações, Visando a Exportação**. 2013. 118p. Dissertação (Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 2013.
- TAVEIRA, L. B.; COSTA, R.G.B.; COSTA JUNIOR, L.C.G.; SOBRAL, D.; de PAULA, J.C.J. Distribuição de NaCl no queijo reino ao longo da maturação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 70, n. 3, p. 141-149, 2015.
- TENÓRIO, C. G. M. S. C. **Microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* e aplicação em queijo prato**. 2012. 157p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2012.
- TONON, R.V., BRABET, C., HUBINGER, M. D. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carregados sobre as propriedades físico-químicas do suco de açaí em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 444-450, 2009.
- TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 225-241, 2014.
- VIDAL, A. M.; DIAS, D. O.; MARTINS, E. S. M.; OLIVEIRA, R. S.; NASCIMENTO, R. M. S.; CORREIA, M. G. S. A ingestão de alimentos funcionais e sua contribuição para a diminuição da incidência de doenças. **Caderno de Graduação – Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 1, n. 15, p. 43-52, 2012.
- VINDEROLA, C.G.; CAPELLINI, B.; VILLARREAL, F.; SUÁREZ, V.; QUIBERONI, A.; REINHEIMER, J.A. Usefulness of a set of simple in vitro test for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 1678-1688, 2008.
- WANG, F.; ZHANG, J. L.; GUO, H.; ZENG, S. S.; REN, F. Effect of proteolysis and calcium equilibrium on functional properties of natural cheddar during ripening and the resultant processed cheese. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 3, p.248-253, 2011.
- WANG, W.; WATERHOUSE, G. I. N.; WATERHOUSE, D. I. S. Co-extrusion encapsulation of canola oil with alginate: Effect of quercetin addition to oil core and pectin addition to alginate shell on oil stability. **Food Research International**, v. 54, p. 837–851, 2013.
- ZHANG, L.; ZHANG, X.; LIU, C.; LI, C.; LI, S.; LI, T.; DA LI; ZHAO, Y.; YANG, Z. Manufacture of Cheddar cheese using probiotic *Lactobacillus plantarum* K25 and its cholesterol-lowering effects in a mice model. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 127-135, 2013.
- ZUIDAM, N. J.; SHIMONI, E. **Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing**. New York, U. S. A.: Springer, 2010.

5 CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO

Esta pesquisa demonstrou o potencial de associação do ácido ascórbico ao alginato de sódio na obtenção de micropartículas potencialmente probióticas contendo *Lb. acidophilus*, e possibilitou em um maior porcentual de sobrevivência do micro-organismo encapsulado durante a vida de prateleira dessas micropartículas, tal como alta eficiência do processo de microencapsulação. Além disso, essas micropartículas apresentaram formato esférico, superfície lisa e sem poros aparentes, bem como um diâmetro médio adequado para aplicação em alimentos, dificultando a percepção sensorial.

A caracterização físico-química das formulações de queijo Reino evidenciou a possível influência da cultura probiótica tanto na forma livre quanto encapsulada, sobre os parâmetros de umidade, gordura, proteína e índice de extensão e profundidade da proteólise. Além disso, observou-se que os queijos tipo Reino contendo *Lb. acidophilus*, seja na forma livre ou encapsulada, favoreceram os parâmetros de textura instrumental de firmeza e mastigabilidade.

Os resultados obtidos para o queijo tipo Reino adicionado de *Lb. acidophilus* na forma livre ou microencapsulada apresentaram viabilidade acima de $7,3 \pm 0,02$ Log UFC/ g e $8,49 \pm 0,08$ Log UFC/ g de *Lactobacillus* spp., respectivamente, após o período de maturação, caracterizando-os como potencialmente probióticos. Além disso, considerando a viabilidade dos lactobacilos totais nos queijos contendo micropartículas na porção de 30 g (> 9 Log UFC), pode-se atribuir potencialidade funcional a eles.

Portanto, o desenvolvimento de micropartículas de *Lb. acidophilus* por gelificação iônica de alginato aditivado de ácido ascórbico contribuiu para a sobrevivência do probiótico e garantiu a viabilidade mínima das bactérias lácticas na fabricação de queijo tipo Reino potencialmente probiótico durante sua maturação. Vislumbra-se, assim, futura aplicação industrial para consumo humano e disponibilização de mais um produto com potencial funcional no mercado.

REFERÊNCIAS

ABADÍA-GARCÍA, L.; CARDADOR, A.; CAMPO, S. T. M. DEL.; ARVÍZU, S. M.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; REGALADO-GONZÁLEZ, C.; GARCÍA-ALMENDAREZ, B.; AMAYA-LLANO, S. L. Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. **International Dairy Journal**, v. 33, p. 191-197, 2013.

ABREU, L. R. **Processamento do leite e tecnologia dos produtos lácteos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2005. 194p.

ALBENZIO, M.; SANTILLO, A.; CAROPRESE, M.; RUGGIERI, D.; NAPOLITANO, F.; SEVI, A. Physicochemical properties of Scamorza ewe milk cheese manufactured with different probiotic cultures. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 2781-2791, 2013.

AMIM, T.; THAKUR, M.; JAIN, S. C. Microencapsulation-The future of probiotic cultures. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 3, n. 1, p. 35-43, 2013

ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 5, p. 240–251, 2007.

ANDREATTA, E.; FERNANDES, A. M.; SANTOS, M. V. DOS.; LIMA, C. G. DE.; MUSSARELLI, C.; MARQUES, M. C.; OLIVEIRA, C. A. F. Effects of milk somatic cell count on physical and chemical characteristics of mozzarella cheese. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 62, n.3, p. 166-170, 2007.

ANJUM, N.; MAQSOOD, S.; MASUD, T.; AHMAD, A.; SOHAIL, A.; MOMIN, A. Lactobacillus acidophilus: Characterization of the Species and Application in Food Production. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 9, p. 1241-1251, 2014.

ANTUNES, E. A. C.; LISERRE, A. M.; FARIA, E. V.; YOTSUIANAGI, K.; LERAYER, A. L. S.; Análise Descritiva Quantitativa de Buttermilk. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 619-629, 2012.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 18th ed, 3th Review, Washington: AOAC, 2010. 1094p.

APHA. American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington, 2001.

BEZERRA, T. K. A. **Estudo da proteólise, lipólise e compostos voláteis em queijo de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas**. 2015. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2015.

BIGLIARDI, B.; GALATI, G. Innovation trends in the food industry: the case of functional foods. **Trends in Food Science & Technology**, 31, 2, 118-129, 2013.

BRAGA, A. L. M.; UBBINK, J. An industrial approach to design/screen encapsulates for best performance in products: fish oil case. Abstract in the Proceedings of 1st South-American Symposium on Microencapsulation, Limeira, 2012.

BRANDON, E. F. A.; OOMEN, A. G.; ROMPELBERG, C. J. M.; VERSANTVOORT, C. H. M.; VAN ENGELEN, J. G. M.; SIPS, A. Consumer product *in vitro* digestion model: bioaccessibility of contaminants and its application in risk assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 44, p. 161-171, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 11 mar. 1996. Seção 1, p. 3977, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probiótico, 2008. Brasília: **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2008.

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

BUREY, P.; BHANDARI, B, R.; HOWES, T.; GIDLEY, M. J. Gel particles from spray-dried disordered polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v.76, p.206-213, 2009.

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

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

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

BURITI, F. C.; ROCHA, J. S. DA.; ASSIS, E. G.; SAAD, S. M. I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **LWT – Food Science and Technology**, v. 38, n. 2, p. 174-180, 2005a.

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 symbiotic *petit-suisse* cheese. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 1037-1046, 2007.

CASTRO-CISLAGHI, F. P. DE.; SILVA, C. DOS. R. E.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; LOREZ, J. G.; SANT'ANNA, E. S. Bifidobacterium Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food engineering**, v. 113, p. 186-193, 2012.

CHALITA, M.A.N. et al. Algumas considerações sobre a fragilidade das concepções de qualidade no mercado de queijos no Brasil. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.39, n.6, jun. 2009.

CHAMPAGNE, C. P.; ROSS, R. P.; SAARELA, M.; HANSEN, K. F.; CHARALAMPOPOULOS, D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, v.149, p.185-193, 2011.

CHEN, M. J.; CHEN, K. N. Applications of probiotic encapsulation in dairy products. In: Lakkis, Jamileh M. (Ed.), **Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems**. Wiley-Blackwell, USA. p. 83–107, 2007.

CHEW, S. C.; TAN, C. P.; LONG, K.; NYAM, K. L. *In-vitro* evaluation of kenaf seed oil in chitosan coated-high methoxyl pectin-alginate microcapsules. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 230–236, 2015.

CHRISTIAN HANSEN. Alternative method for enumeration of *Bifidobacteria* in fermented milk products – Guideline. Technical bulletin – p.12, 2007.

CICHOSKI, A. J.; CUNICO, C.; DI LUCCIO, M.; ZITKOSKI, J. L.; CARVALHO, L. 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, p. 214-219, 2008.

COLES, L. T.; MOUGHAN, P. J.; DARRAGH, A. J. *In vitro* digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. **Animal Food Science and Technology**, v. 123-124, p. 421-444, 2005.

COMAN, M. M.; CECCHINI, C.; VERDENELLI, M. C.; SILVI, S.; ORPIANESE, C.; CRESCI, A. Functional foods as carriers for SYN BIO®, a probiotic bacteria combination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 3, p. 346-352, 2012.

CRUZ, A.; BURITI, F. C. A.; De SOUZA, C. H. B.; FARIA, J. A. F.; SAAD, S. M. I. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 8, p. 344-354, 2009.

DA SILVA, T. M.; RODRIGUES, L. Z.; CODEVILLA, C. F.; SILVA, C. B.; MENEZES, C. R. Coacervação complexa: uma técnica para a encapsulação de probióticos. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 49-55, 2015.

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Effect of cysteine on the viability of yogurth and probiotic bacteria in yogurths made with commercial starter cultures. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 537-545, 1997a.

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Effect of the level of starter culture on viability of yoghurth and probiotic bacteria in yogurths. **Food Australia**, v. 49, p. 164-168, 1997b.

DE PRISCO, A., MARESCA, D., ONGENG, D., MAURIELLO, G. Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, p. 452-462, 2015.

DE VOS, P.; FAAS, M. M.; SPASOJEVIC, M.; SIKKEMA, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 4, p. 292-302, 2010.

DING, W. K.; SHAH, N. P. An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 2, p. 53-61, 2009.

ETCHEPARE, M. A.; RADDATZ, G. C.; FLORES, E. M. M.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, G. C.; BARIN, J. S.; GROSSO, C. R. F.; MENEZES, C. R. Effect of resistance starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. **LWT- Food Science and Technology**, v. 65, p. 511-517, 2016.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols – a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 10, p. 510-523, 2010.

FAO/WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Report of a joint FAO/WHO working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. World Health Organization, London Ontario, Canada, 2002.

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

FOOD INGREDIENTS BRASIL. A microencapsulação a serviço da indústria alimentícia. Nº25, 2013.

FRITZEN-FREIRE, C. B.; PUDÊNCIO, E. S.; PINTO, S. S. MUÑOS, I. B.; MULLER, C. M. O.; VIEIRA, C. R. W.; AMBONI, R. D. M. C. Effect of the application of *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulated by spray drying with prebiotics on the properties of ricotta cream. **Food Research International**, v. 52, p. 50-55, 2013.

FURTADO, M. M. **Queijo com olhaduras**. 1 ed. São Paulo: Fonte Comunicações, 2007. 179 p.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. Metodologia básica de fabricação de queijo Reino. **Informativo Há-la Biotec**, Valinhos, São Paulo, n. 49, p. 2, jan, 1999.

FURTADO, M. R. A. **Caracterização histórica, tecnologia de fabricação, características físico-químicas, sensoriais, perfil de textura e de comercialização do queijo Reino**. 2008. 95 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

GARCIA, E. F.; OLIVEIRA, M. E. G. DE.; QUEIROGA, R. C. R. E.; MACHADO, T. A.; SOUZA, E. L. Development and quality of Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 8, p. 947-956, 2012.

GARCÍA-CEJA, A.; MANI-LÓPEZ, E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined lactobacilli encapsulated in alginate or alginate-chitosan. **LWT – Food Science and Technology**, v. 63, p. 482-489, 2015.

GARCIA-RUIZ, A.; LLANO, D. G.; ESTEBAN-FERNÁNDEZ, A.; REQUENA, T.; BARTOLOMÉ, B.; MORENO-ARRIBAS, V. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. **Food microbiology**, v. 44, p. 220-225, 2014.

GARDINER, G.; ROSS, R. P.; COLLINS, J. K.; FITZGERALD, G.; STANTON, C. Development of a probiotic cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. **Applied and Environmental microbiology**, v. 64, p. 2192-2199, 1998.

GEBARA, C.; RIBEIRO, M. C. E.; CHAVES, K. S.; GANDARA, A. L. N.; GIGANTE, M. L. Effectiveness of different methodologies for the selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* La5 from yoghurt and Prato cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p. 508-513, 2015.

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

GONZÁLEZ-OLIVARES, L. G.; LÓPEZ-CUELLAR, Z. L.; AÑORVE-MORGA, J.; FRANCO-FERNANDÉZ, M. J.; CASTÑEDA-OVANDO, A.; CONTRERAS-LÓPEZ, E.; JAIMEZ-ORDAZ, J.; RODRIGUEZ-SERRANO, G. M. Viability and Proteolytic Capacity of *Lactobacillus bulgaricus* 2772 and *Lactobacillus rhamnosus* GG during Cheese Ripening. **Journal of Biosciences and Medicine**, v. 2, p. 7-12, 2014.

GUIMARÃES, T. F.; CARVALHO, G. R.; CARNEIRO, A. V.; DUARTE, M. M. **Exportações mundiais de queijos: 2003 a 2007**. X Minas Leite. 2008. Disponível em: <http://www.cileite.com.br/sites/default/files/exportacoes_mundiais_de_queijos_2003_a_2007.pdf>. Acesso em 03 ago. 2016.

HAYES, M.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P. Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part I: Overview. **Biotechnology Journal**, v. 2, p. 426-434, 2007.

HEIDEBACH, T.; FORST, P.; KULOZIK, U. Microencapsulation of probiotics cells by means of rennet-gelation of milk proteins. **Food hydrocolloids**, v. 23, p. 1670-1677, 2009.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, p. 506-514, 2014.

IDF – FERMENTED and NON-FERMENTED MILK PRODUCTS –: Detection and Enumeration of *Lactobacillus acidophilus*: culture media. In: **Bulletin of International Dairy Federation**, Brussels n. 306, p.23, 1995.

ILSI EUROPE. Consensus Document: Scientific Concepts of Functional Foods in Europe. **British Journal of Nutrition**, v. 81, p. 1–27, 1999.

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

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.

KIM, E. R.; LEE, K. W.; PARK, Y. H. The study of lactic acid bacteria in yoghurt during delivery and storage. **Korean Journal of Dairy Science**, v. 14, n. 3, p. 260-268, 1993.

KIM, S. J.; CHO, S. Y.; KIM, S. H.; SONG, O. J.; SHIN, I. S.; CHA, D. S.; PARK, H. J. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 493-500, 2008.

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

KRASAEEKOOPT, 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, 2003a.

LECLERC, P. L.; GAUTHIER, S. F.; BACHELARD, H.; SANTURE, M.; ROY, D. Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. **International Dairy Journal**, v. 12, 995-1004, 2002.

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

LI, B.; WANG, L.; LI, D.; BHANDARI, B.; LI, S.; LAN, Y.; CHEN, X.; MAO, Z. Fabrication of starch-based microparticles by an emulsification-crosslinking method. **Journal of Food Engineering**, v.92, p.250-254, 2009.

LI, X. Y.; CHEN, X. G.; CHA, D. S.; PARK, H. J.; LIU, C. S. Microencapsulation of probiotic bacteria with alginate-gelatin and its properties. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, n. 4, p. 315-324, 2009.

LI, X. Y.; CHEN, X. G.; SUN, Z. W.; PARK, H. J.; CHA, D. S. Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1479-1485, 2011.

LIMA, J. R.; LOCATELLI, G. O.; FINKLER, L.; LUNA-FINKLER, C. L. Incorporação de *Lactobacillus casei* microencapsulado em queijo tipo coalho. **Revista Ciência & Saúde**, v. 7, n. 1, p. 27-34, 2014.

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.

MARTIROSYAN, D. M.; SINGH, J. A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? **Functional Foods in Health and Disease**, v. 5, n. 6, p. 209-223, 2015.

MAZOCHI, V.; MATOS JÚNIOR, F. E.; VAL, C. H.; DINIZ, D. N.; RESENDE, A. F. Iogurte probiótico produzido com leite de cabra suplementado com *Bifidobacterium* spp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p. 1484-1490, 2010.

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

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; PARK, Y. Controlling lipid bioavailability through physicochemical and structural approaches. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, p. 611-618, 2009.

MEIRA, Q. G. S. **Produção e caracterização de ricota caprina adicionada de bactérias probióticas**. 142p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2015.

MENEZES, C. R. D.; BARIN, J. S.; CHICOSKI, A. J.; ZEPKA, L.; JACOB-LOPES, E.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, v. 43, n. 7, 2013.

MIRZAEI, H.; POURJAFAR, H.; HOMAYOUNI, A. Effect of calcium alginate and resistance starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* La5 and sensory properties in Iranian White brined cheese. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1966-1970, 2012.

OLIVEIRA, E. M. G.; GARCIA, E. F.; QUEIROGA, R. C. R. E.; SOUZA, E. L. Technological, physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **Scientia Agricola**, v. 69, n. 6, p. 370-379, 2012.

OLIVEIRA, M. E. G. **Queijo coalho caprino adicionado de bactérias lácteas: elaboração caracterização e avaliação *in vitro* de potencial probiótico**. 162p. Tese (Doutorado em Ciência da Nutrição). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2013.

OLIVEIRA, M. E. G.; GARCIA, E. F.; OLIVEIRA, C. E. V.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. M. E.; MADUREIRA, A. R. M. F.; CONCEIÇÃO, M. L.; QUEIROGA, R. C. R. E.; SOUZA, E. L. Addition of probiotic bacteria in semi-hard goat cheese (coalho): survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against of pathogenic bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 241-247, 2014.

ONG, L. HENRIKSSON, A.; SHAH, N. P. Chemical analysis and sensory evaluation of Cheddar cheese produced with *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* or *Bifidobacterium* spp. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 8, p. 937-945, 2007a.

ONG, L. HENRIKSSON, A.; SHAH, N. P. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* or *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 5, p. 446-456, 2006.

ONG, L. HENRIKSSON, A.; SHAH, N. P. Proteolytic patterns and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by proiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* or *Bifidobacterium* spp. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 1, p. 67-78, 2007b.

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

PADILHA, M. **Queijo petit-suisse probiótico e simbiótico: características tecnológicas e emprego de técnicas dependentes e independentes de cultivo na avaliação da sobrevivência dos probióticos no produto e em ensaios de sobrevivência in vitro**. 2013. Mestrado. Tecnologia de alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PASQUALIM, P., CULPI, T.A.; KAMINSKI, G. A. T.; FIN, M. T.; SASSO, D. G. B., COSTA, C. K., MIGUEL, M. D., FUJIWARA, G. M., RODRIGUES, B. H., ZANIN, S. M. W. Microcapsules of calcium alginate and vegetable oil by ionic gelation: a study of encapsulation capacity and skin application. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 11, n. 1, 2010.

PEDROSO, D. D. L., THOMAZINI, M., HEINEMANN, R. J. B., FAVARO-TRINDADE, C. S. Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spraychilling. **International Dairy Journal**, v. 26, n. 2, p. 127–132, 2012.

PINTINO, I.; RANDAZZO, C. L.; CROSS, K. L.; PARKER, M. L.; CARLO BISIGNANO; WICKHAM, M. S. J.; GIUSEPPINA MANDALARI; CINZIA CAGGIA. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains inoculated in cheese matrix during simulated human digestion. **Food Microbiology**, v. 31, p. 57-63, 2012.

RACOVITĂ, S., VASILIU, S., POPA, M., LUCA, C. Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 54, n. 9, p. 709–718, 2009.

RAJAM, R.; KARTHIK, P.; PARTHASARATHI, S.; JOSEPH, G. S.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Effect of whey protein-alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, v. 4, p. 891-898, 2012.

RIBEIRO, M. C. E.; CHAVES, K. S.; GEBARA, C.; INFANTE, F. N. S.; GROSSO, C. R. F.; GIGANTE, M. L.; Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. **Food Research International**, v. 66, p. 424-431, 2014.

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

ROLIM, F. R. L. **Avaliação do efeito protetor de queijo de coalho caprino na sobrevivência de uma nova cepa com potencial probiótico.** 2015. 72p. Dissertação (Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba – Paraíba, 2015.

SABIKHI, L.; KUMAR M. H.; MATHUR, B. N. Bifidobacterium bifidum in probiotic Edam cheese: influence on cheese ripening. **Journal Food Science Technology**, v. 51, n. 12, p. 2902-3909, 2013.

SACCHETIN, P. S. C.; MORAES, A. M.; LEAL, C. A. G.; FIQUEIREDO, H. C. P. Produção de micropartículas de alginato contendo *Flavobacterium columnare* inativada pelo método de emulsão para vacinação de peixes por via oral. **Quimica nova**, v. 33, n. 2, p. 263-268, 2010.

SALLANS, F.; RODRIGUEZ, F.; SABLAYROLLES, B.; COMBES, A.; PATAU, J. P.; ROUFFIAC, R. Étude comparative de cinq spécialités de théophylline a leberation prolongée. **Journal of Pharmacie Belgique**, Bruxelles, v. 2, n. 43, p. 81-87, 1998.

SANTIESTEBAN-LÓPEZ, A.; LÓPEZ-MALO, A.; GÓMEZ-DÍAZ, J. J.; PÉREZ-ARMENDÁRIZ, B. Effect of L-cysteine and ascorbic acid on the propagation of *Lactobacillus casei* in milk. **International Research Journal of Microbiology**, v. 4, 113-118p, 2013.

SANTOS, K. O. DOS.; EGITO, A. S. DO.; BOMFIM, M. A. D.; BENEVIDES, S. D.; Produção de queijos probióticos para agregação de valor ao leite caprino. **EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS**, 2008, Sobral: EMBRAPA.

SARKAR, S. Approaches for enhancing the viability of probiotics: a review. **British Food Journal**, v. 112, n. 4, p. 329-349, 2010.

SAUVANT, P.; CANSSELL, M.; SASSI, A.H.; ATGIÉ, C. Vitamin A enrichment: Caution with encapsulation strategies used for food applications. **Food Research International**, v. 46, p. 469–479, 2012.

SAVINE, M.; CECCHINI, C.; VERDENELLI, M.C.; SILVI, S.; ORPIANESI, C.; CRESCI, A. Pilot-scale production and viability analysis of freeze-dried probiotic bacteria using different protective agents. **Nutrients**, v. 2, p. 330-339, 2010.

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

SHISHATA, A. Y.; SHAH, N. P. Bacteriocin produced by *S. thermophilus* against *Bifidobacterium* species. **International Dairy Journal** v. 5, p. 515-521, 1999.

SILVA, K. C. G. **Produção de microgéis simbióticos de gelatina-alginato e simulação da liberação controlada em condições gastrointestinais**. 2016. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2016.

SILVA, K. C. G; CEZARINO, E. C.; MICHELON, M.; SATO, A. C. K. Symbiotic microencapsulation to enhance *Lactobacillus acidophilus* survival. **LWT – Food Science and Technology**, v. 89, p. 503-509, 2018.

SILVEIRA, A. C. **Fabricação e avaliação da maturação de queijo Prato obtido a partir de leite pré-acidificado com CO₂ e redução de coagulante**. 2009. 80 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, São Paulo, 2009.

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

SOUZA, F.; GEBARA, C.; RIBEIRO, M. C. E.; CHAVES, K. S.; GIGANTE, M. L.; GROSSO, C. R. F. Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins. **Food Research International**, v. 49, p. 560-566, 2012.

SUNNY-ROBERTS, E. O.; KNNOR, D. The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 209-214, 2009.

TALWALKAR, A.; KAILASAPATHY, K. The Role of Oxygen in the Viability of Probiotic Bacteria with Reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 5, p. 1-8, 2004.

TAVEIRA, L. B. **Aspectos Físico-químicos e Sensoriais do Queijo do Reino maturado sob Diferentes Concentrações, Visando a Exportação**. 2013. 118p. Dissertação (Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 2013.

TAVEIRA, L. B.; COSTA, R.G.B.; COSTA JUNIOR, L.C.G.; SOBRAL, D.; de PAULA, J.C.J. Distribuição de NaCl no queijo reino ao longo da maturação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 70, n. 3, p. 141-149, 2015.

TAVERNITI, V.; GUGLIELMETTI, S. Health-promoting properties of *Lactobacillus helveticus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-13, 2012.

TENÓRIO, C. G. M. S. C. **Microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* e aplicação em queijo prato**. 2012. 157p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2012.

THARMARAJ, N.; SHAH, N. P. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* spp *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Propionibacteria*. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2288-2296, 2003.

TOTOSAUS, A.; ARIZA-ORTEGA, T. D. J.; PÉREZ-CHABELA, M. D. L. Lactic acid bacteria microencapsulation in sodium alginate and other gelling hydrocolloids mixtures. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 52, n. 2, p. 107-120, 2013.

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

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

VESTERLUND, S.; SALMINEN, K.; SALMINEN, S. Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: A case of study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed. **International Journal of Food Microbiology**, 157, 319-321, 2012.

VINDEROLA, C.G.; CAPELLINI, B.; VILLARREAL, F.; SUÁREZ, V.; QUIBERONI, A.; REINHEIMER, J.A. Usefulness of a set of simple in vitro test for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 1678-1688, 2008.

WANG, F.; ZHANG, J. L.; GUO, H.; ZENG, S. S.; REN, F. Effect of proteolysis and calcium equilibrium on functional properties of natural cheddar during ripening and the resultant processed cheese. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 3, p.248-253, 2011.

WANG, W.; WATERHOUSE, G. I. N.; WATERHOUSE, D. I. S. Co-extrusion encapsulation of canola oil with alginate: Effect of quercetin addition to oil core and pectin addition to alginate shell on oil stability. **Food Research International**, v. 54, p. 837–851, 2013.

ZHANG, L.; ZHANG, X.; LIU, C.; LI, C.; LI, S.; LI, T.; DA LI; ZHAO, Y.; YANG, Z. Manufacture of Cheddar cheese using probiotic *Lactobacillus plantarum* K25 and its cholesterol-lowering effects in a mice model. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 127-135, 2013.

ZUIDAM, N. J.; SHIMONI, E. **Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing**. New York, U. S. A.: Springer, 2010.