



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

APLICAÇÃO DE PROBIÓTICOS MICROENCAPSULADOS EM LEITES FERMENTADOS

Sérgio T. **Watanabe Jr.**¹; Eliane M. **Brolazo**²;

Renato A. R. **Gomes**³; Aline **Garcia**⁴; Darlila A. **Gallina**⁵

¹ Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp; ^{2, 3, 5} Instituto de Tecnologia de Alimentos, TecnoLat; ⁴ Instituto de Tecnologia de Alimentos, CCQA

Nº 14249

RESUMO – Foram empregadas duas culturas probióticas comerciais (*B. animalis* ssp. *lactis* e *Bifidobacterium animalis* ssp. *bifidum*) na obtenção de microcápsulas por secagem em *spray dryer*. Estas micropartículas probióticas foram avaliadas em condições simuladas do ambiente gástrico e intestinal e quanto à estabilidade às condições de armazenamento. Verificou-se a manutenção da viabilidade dos probióticos com e sem microencapsulação em iogurte. O probiótico selecionado foi o *B. animalis* subsp. *lactis* (Howaru Bifido HN 019), sem microencapsulação, o qual apresentou o melhor rendimento em iogurte durante 30 dias mantendo 97,91% da contagem inicial. Este probiótico foi aplicado em leite fermentado com polpa de frutas vermelhas (n=3) e o produto avaliado com um dia, quanto a qualidade microbiológica, viabilidade dos probióticos e composição físico-química. A aceitabilidade foi realizada com 10 dias. Avaliou-se a viabilidade da cultura probiótica, pH e acidez titulável ao longo de 30 dias de estocagem. O leite fermentado apresentou qualidade higiênica sanitária apropriada e composição média de: pH de 4,76; acidez titulável de 0,81 g ácido láctico %; extrato seco total de 17,50%; gordura total de 0,2%; proteína total de 3,9%; cinzas de 1,04 % e carboidratos totais de 12,36%. O probiótico Howaru Bifido (HN 019) manteve-se em 8 log UFC.gr⁻¹ durante 30 dias sob refrigeração, apesar do pH e acidez desfavoráveis. O produto obteve mais de 75% de aceitação para os atributos avaliados, destacando-se a aparência, o sabor e a consistência que obtiveram avaliações médias entre “gostei muito” e “gostei”, sendo que 53,3% dos consumidores demonstraram atitude positiva quanto à intenção de compra.

Palavras-chaves: iogurte, microcápsulas, bifidobactérias, polpa de frutas, viabilidade.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIT): Graduação em Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas-SP; sergio.watanabejr@gmail.com

2,3 Colaborador, Pesquisador científico, TecnoLat, ITAL, Campinas-SP.

4 Colaborador, Pesquisador científico, CCQA, ITAL, Campinas-SP.

5 Orientador: Pesquisador científico, TecnoLat, ITAL, Campinas-SP; darlila@ital.sp.gov.br



ABSTRACT- *Two commercial probiotic cultures (*B. animalis* ssp. *Lactis* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *Bifidum*) were used to obtain microcapsules by spray drying. These probiotic microparticles were evaluated in simulated gastric and intestinal conditions and for its stability in storage conditions. There was maintaining the viability of probiotics with and without microencapsulation in yogurt. The choice probiotic was *B. animalis* subsp. *lactis* (Howaru Bifido HN 019) without microencapsulation, which showed the best performance in yoghurt for 30 days by holding 97.91% of the initial count. This one was applied in probiotic fermented milk with red fruit pulp ($n = 3$) and the product was rates after a day, as the microbiological quality, viability of probiotics and physico-chemical composition. The acceptability was made after 10 days. There was evaluated the probiotic viability, pH and titratable acidity during 30 days of storage. The fermented milk showed proper sanitary hygienic quality and composition (average) of pH 4.76; titratable acidity of 0.81 g lactic acid %; 17.50% of total dry matter; 0.2% of total fat; 3.9% of total protein; 1.04% of ashes and 12.36% of total carbohydrates. The Probiotic Bifido Howaru (019 HN) kept on log 8 UFC.gr-1 for 30 days refrigerated, despite of adverse pH and acidity. The product has obtained more than 75% acceptance for the attributes evaluated, highlighting the appearance, flavor and consistency that had average ratings between "Like so much" and "Like", 53.3% of consumers have shown positive attitude regarding the purchase intent.*

Key-words: yoghurt, microcapsules, bifidobacteria, fruit pulp, viability.

1 INTRODUÇÃO

O mercado de alimentos e bebidas funcionais emergiu como um dos segmentos mais dinâmicos da indústria de alimentos em geral. O crescimento no mercado de alimentos funcionais também é impulsionado pela capacidade dos ingredientes funcionais em oferecer benefícios terapêuticos.

A indústria de alimentos, especialmente o setor de laticínios, tem adicionado culturas probióticas para conferir propriedades funcionais aos seus produtos. Leites fermentados e iogurtes contendo probióticos são os principais produtos comercializados no mundo com alegação de promover saúde (SAAD, 2006). A fusão de produtos lácteos e bebidas de frutas marca a introdução de "juiceceuticals" como bebidas de iogurte e frutas que são exemplos típicos de produtos lácteos híbridos oferecendo saúde, sabor e conveniência (KRUPA et al., 2011). A viabilidade e a estabilidade de culturas probióticas têm sido um desafio tecnológico para as indústrias processadoras. Alimentos probióticos devem conter linhagens específicas de micro-organismos



probióticos e manter um nível apropriado de células viáveis durante o armazenamento do produto, sem interferir no sabor e textura (GALLINA et al., 2012).

A microencapsulação é definida como o processo de empacotamento de moléculas ou partículas. Sendo uma tecnologia nova utilizada na indústria de alimentos como uma alternativa eficiente para a proteção de microrganismos probióticos, o que pode aumentar a resistência de microrganismos probióticos, garantindo a viabilidade celular em alimentos e também durante a passagem destes pelo suco gástrico e entérico. Dentre as várias técnicas de encapsulação, a atomização por *spray dryer* é uma das mais utilizadas, além de produzir um produto de boa qualidade, é econômica e pode ser aplicada em grandes escalas na indústria de alimentos (JACKSON, LEE, 1993).

Este projeto objetivou elaborar microcápsulas contendo culturas probióticas de bifidobactérias utilizando o método de microencapsulação por secagem em *spray dryer*, avaliando a estabilidade dos probióticos microencapsulados em leites fermentados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Material

Cultura termofílica Yo-mix-863 LYO (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*); culturas probióticas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Howaru Bifido HN 019) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *bifidum* (Bb-12); leite em pó desnatado (Molico, Nestlé); polpa de frutas vermelhas (morango/framboesa/amora) (De Marchi); sacarose (açúcar União).

Métodos

2.1. Suspensão e contagem da cultura de iogurte

Efetuuou-se a suspensão da cultura Yo-mix-863 LYO em leite tipo A integral tratado termicamente (115°C/15 min.). As alíquotas foram estocadas a -22°C. Determinou-se a curva de fermentação da cultura à 44±1°C até pH 4,7±1 e realizou-se a contagem das bactérias lácticas.

2.2. Preparo dos probióticos para microencapsulação

O material liofilizado (1,0 g) de Bb-12 foi homogeneizado em 100 mL de leite desnatado (12%) suplementado com glicose e extrato de levedura (LDRS) foi autoclavado à 115°C/15 min., alíquotado e estocado a -22°C. O probiótico Howaru liofilizado (40 g) foi homogeneizado em 1 L de leite integral, tratado termicamente à 115°C/15 min. Foi alíquotado e estocado a -22°C.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

Para reativação dos probióticos, antes de cada experimento, as alíquotas foram descongeladas e incubadas à $37\pm 1^\circ\text{C}/24$ horas, subcultivadas em 50 ml de LDRS 12% para obtenção da cultura na fase exponencial de crescimento (ativa).

A cada porção de 100 mL de solução encapsulante (LDR 10%) foi adicionado 10 mL do probiótico ativado (1:10). Esta mistura foi atomizada em Mini *Spray dryer* modelo Bünchi B-290 (Flawil, Switzerland), nos parâmetros: temperatura de entrada do ar a 110°C , temperatura média de saída de 70°C , fluxo do ar a 439 L/h, vazão de 6 mL/min. e utilização do *Noozler Cleaner* no parâmetro 3. O pó seco de microcápsulas foi coletado na parte inferior do ciclone e transferido para tubos cônicos estéreis fechados e armazenados em dessecador mantido à $7\pm 2^\circ\text{C}$. A eficiência da encapsulação foi calculada através da fórmula: $\text{RE} = (\log N / \log N_0) \times 100$, onde o RE é o rendimento ou eficiência da encapsulação, expresso em porcentagem, N_0 é o número de células viáveis (UFC/g) na matriz encapsulante antes da secagem e N é o número de células viáveis (UFC/g) no material seco (REDDY, 2009).

2.3. Contagem das culturas probióticas (com e sem microencapsulação)

A contagem de células viáveis dos probióticos foi realizada pela a técnica de semeadura em profundidade em meio Ágar MRS. As diluições das amostras foi realizada em água peptonada 0,1%. As placas de MRS foram incubadas em anaerobiose por 72 horas a $37\pm 1^\circ\text{C}$.

2.4. Determinação da viabilidade do probiótico microencapsulado

Antes de cada diluição do material seco para a contagem de células, foi realizada a dissolução (1:10) das micropartículas solução tampão fosfato pH 7,5, e este homogeneizado mantido durante 3 horas em *shaker* a 150 rpm a 37°C , para liberação das células viáveis.

2.5. Padrão de liberação às condições gastrintestinais

As características de estabilidade e liberação das micropartículas probióticas em condições simuladas do ambiente gástrico e intestinal foram avaliadas com base nos procedimentos de Gebara (2012) e Annan (2007). Para tal, foi preparado o SGA (suco gástrico artificial) com KCl (1,12g/l), NaCl (2g/l), CaCl_2 (0,11g/l) e KH_2PO_4 (0,4g/l), acrescentadas as enzimas mucina (3,5g/l) e pepsina (0,26g/l) e pH ajustado a 1,2 com HCl. As amostras foram adicionadas na proporção 1:10 a esta solução e incubadas a 37°C sob agitação (*shaker* 150rpm), por 2 horas. Alíquotas foram coletadas nos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos, para diluição e contagem em placa. Sendo que a primeira diluição foi feita em tubo contendo solução tampão PBS pH 7,5, e as seguintes em água peptonada. Em seguida o material foi centrifugado a 6000rpm (=4677 xg) /15 min/ 4°C para inativação das enzimas e ressuspenso em PBS pH 7,5 contendo sais biliares (4,5g/l) e



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

pancreatina (1,1g/l), o que corresponde ao SIA (suco gástrico intestinal). Foram coletadas alíquotas nos tempos 0, 60, 120 minutos de incubação para as contagens bacterianas. Como controle utilizou-se partículas não submetidas ao ambiente gástrico simulado, ou seja o probiótico livre (cultura ativa em LDR 10%), submetido às condições simuladas do TGI.

2.6. Estabilidade às condições de armazenamento

Porções de micropartículas foram acondicionadas em frascos e estocadas em diferentes condições (temperatura ambiente, congelamento e refrigeração) durante 120 dias. Em intervalos regulares de 30 dias, a viabilidade dos probióticos foi determinada por contagem em placas.

2.7. Avaliação dos probióticos com e sem microencapsulação na elaboração de iogurte

Preparou-se iogurtes utilizando leite em pó desnatado reconstituído (14%) tratado termicamente a 85°C/ 20-30 minutos, resfriado (4-4°C) e adicionado da cultura termofílica (*Yomix 863 LYO*) e das culturas probióticas ativadas (sem microencapsulação). A fermentação foi conduzida até pH 4,7±0,1. Para obtenção dos iogurtes com probióticos microencapsulados, após a fermentação com a cultura termofílica, resfriados à 15-20°C e adicionados de 10 g das microcápsulas. Os iogurtes foram estocados a 8±2°C e analisados quanto à viabilidade dos probióticos no produto, nos dias 1, 15 e 30. Os experimentos foram realizados em duplicata (n=2).

2.8. Elaboração e caracterização do leite fermentado com polpa de frutas vermelhas

O produto foi elaborado em triplicata (n=3), foi preparado leite em pó desnatado reconstituído (14%) adicionado de 10% de sacarose, sendo tratado termicamente à 85°C/ 20-30 min., resfriado (42-44°C) e adicionado de 0,6% da cultura termofílica e 2% da cultura probiótica ativada (*Howaru Bifido - HN 019*). A fermentação foi conduzida até pH 4,7±0,1. O leite fermentado foi resfriado (15-20°C) e adicionado da polpa de frutas vermelhas (18%) e 0,03% de sorbato de potássio. As amostras obtidas foram estocadas em câmara fria a 8±2°C.

O produto foi elaborado em triplicata (n=3) e avaliado microbiologicamente (coliformes a 30-35°C e 45°C e bolores e leveduras), quanto a viabilidade da cultura probiótica, composição físico-química (pH, acidez titulável, extrato seco total, gordura, proteína total, cinzas, carboidratos totais) de acordo com BRASIL (2006), atividade de água e susceptibilidade a sinérese com 1 dia de fabricação. Amostras foram avaliadas quanto a viabilidade da cultura probiótica, atividade de água, sinérese, pH e acidez titulável nos dias 1, 10, 20 e 30. O teste de aceitabilidade do produto foi realizado após 10 dias de fabricação.

2.8.1. Análises Microbiológicas



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

A contagem seletiva dos probióticos foi realizada de acordo com o Boletim Técnico da Chr-Hansen (Technical Bulletin P-12), com adaptações, empregando-se ágar MRS, suplementado com 10% de cloreto de lítio 10%, 5% de dicloxacilina e 5% de L-cisteína, incubando-se a $37\pm 1^\circ\text{C}$ em anaerobiose por 72 ± 3 horas, nos dias 1, 10, 20 e 30.

A determinação de coliformes a $30\text{-}35^\circ\text{C}$ foi realizada por meio do procedimento dos tubos múltiplos ou número mais provável (NMP) e os coliformes termotolerantes a 45°C em Caldo Laurilsulfato, avaliado-se à fluorescência em luz ultravioleta, de acordo com Wehr & Frank (2004). Os bolores e leveduras foram determinados em Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol com incubação por 5 dias a $25\pm 1^\circ\text{C}$ (WEHR & FRANK, 2004).

2.8.2. Análises Físico-químicas

O pH, teor de acidez titulável, extrato seco total e gordura foram determinados de acordo com BRASIL (2006). O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método oficial de Kjeldahl, segundo o INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1993). O teor de proteína total foi calculado multiplicando-se o conteúdo de nitrogênio total por 6,38. O teor de resíduo mineral fixo (cinzas) foi determinado de acordo com Horwitz (2000). O teor de carboidratos totais foi determinado por diferença: carboidratos totais = $[100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ cinzas} + \% \text{ proteína} + \% \text{ gordura})]$.

Foram avaliadas atividade de água, sinérese, pH e acidez titulável, após 1, 10, 20 e 30 dias.

2.8.3. Aceitabilidade do leite fermentado probiótico

Após dez dias de fabricação, sessenta consumidores de leite fermentado/iogurte de frutas sem restrições quanto à idade, ao sexo e à classe social avaliaram a amostra quanto à aceitabilidade de modo geral e em particular da aparência, da consistência e do sabor por meio de escalas hedônicas de 9 pontos (9=gostei muitíssimo, 5=não gostei nem desgostei e 1=desgostei muitíssimo), quanto à cor, consistência, sabor de frutas vermelhas, acidez e doçura por meio de escala do ideal de 7 pontos (7=muito mais escura/ sabor de frutas vermelhas muito mais intenso/ ácida/ doce/ consistente do que eu gosto, 4=do jeito que eu gosto e 1=muito mais clara, sabor de frutas vermelhas muito menos intenso/ ácida/ doce/ consistente do que eu gosto). Os consumidores responderam sobre a intenção de compra com escala de 5 pontos (5=certamente compraria, 3=talvez comprasse/talvez não comprasse e 1=certamente não compraria).

A amostra foi apresentada a temperatura entre 5 e 10°C em copos descartáveis de 50 ml com código de três números aleatórios, sendo oferecida água mineral natural visando limpar o palato. O teste foi conduzido em cabines individuais com iluminação de lâmpadas fluorescentes e equipadas com o sistema computadorizado *Compusense Five* versão 5.4 para coleta e análise dos



dados. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Resistência dos probióticos as condições gastrointestinais

O rendimento das microcápsulas das culturas probióticas foi de 99,63% para Howaru Bifido e 75,21% para Bb-12. Os probióticos sem microencapsulação apresentaram rendimento entre 55 e 60%. Portanto as bifidobactérias demonstraram boa resistência em pH ácido.

3.2. Estabilidade das microcápsulas quanto às condições de armazenamento

Observou-se que o número de células viáveis nas micropartículas de Bb-12 teve um decréscimo mais acentuado comparado com a Howaru Bifido, após 120 dias de armazenamento. Sendo que a Bb-12 se mostrou mais estável quando mantida sob refrigeração, enquanto o outro probiótico, quando mantido congelado, obteve um rendimento de 80,54 %, o que condiz com o comportamento descrito por Maus; Ingham (2003) para a bifidobactérias.

3.3. Avaliação da estabilidade dos probióticos com e sem microencapsulação na elaboração de iogurte

A viabilidade dos probióticos (Tabela 1) em cultura livre se manteve em torno de 8 log UFC/g, enquanto as microcápsulas ficaram entre 5,5 e 6,8 log UFC/g, demonstrando uma diminuição das células viáveis após a microencapsulação. Este comportamento foi observado quando se realizou a contagem da cultura livre e das microcápsulas, antes da aplicação no produto, apesar do melhor rendimento das microcápsulas no teste de simulação gastrointestinal.

Tabela 1. Viabilidade dos probióticos (log UFC. gr⁻¹) no iogurte após 1, 15 e 30 dias.

Tempo de estocagem (Dias)	iogurte com Cultura de Howaru		iogurte com Microcápsulas de Howaru		iogurte com Cultura de Bb-12		iogurte com Microcápsulas de Bb-12	
	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
1	8,59	8,62	6,51	6,85	8,26	8,45	6,11	6,03
15	8,37	8,55	6,36	6,79	8,24	8,19	5,76	5,80
30	8,34	8,51	6,18	6,49	8,06	8,15	5,53	5,76

P1: Processamento 1; P2: Processamento



3.4. Caracterização do leite fermentado probiótico com polpa de frutas vermelhas

Visto que as microcápsulas não apresentaram desempenho similar à cultura livre quanto à viabilidade dos probióticos, nem garantiu a proteção esperada durante a estocagem decidiu-se utilizar a cultura Howaru Bifido, na elaboração de leite fermentado com polpa de frutas vermelhas.

A viabilidade dos probióticos durante 30 dias de estocagem está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Viabilidade dos probióticos (log UFC. g⁻¹) no leite fermentado após 1, 10, 20 e 30 dias.

Tempo de estocagem (Dias)	P1	P2	P3
1	8,19	8,33	7,89
10	8,19	8,23	7,85
20	8,07	8,18	7,95
30	8,02	8,04	7,94

P1: Processamento 1; P2: Processamento 2; P3: Processamento 3.

Portanto, o produto se apresentou de acordo com a legislação vigente para alimentos funcionais, que estabelece uma quantidade mínima viável para os probióticos na faixa de 10⁸ a 10⁹ UFC na recomendação diária do produto pronto para consumo (ANVISA, 2008). De acordo com o MAPA (BRASIL, 2007), quando se emprega o uso de bifidobactérias, a contagem deverá ser de no mínimo 10⁶ UFC/g. Portanto, o leite fermentado elaborado atende esta legislação, já que até o final do período de estocagem estudado manteve esta quantidade mínima estipulada.

As contagens de bolores e leveduras nas bebidas (n=3) ficaram entre 10 e 50 UFC/g, enquanto as contagens de coliformes a 30-35°C e 45°C foram <0,3 NMP/g, durante 30 dias, atestando a qualidade higiênico-sanitária e estando dentro dos limites estipulados pela legislação (BRASIL, 2007).

O leite fermentado apresentou composição físico-química média de: pH de 4,76; acidez titulável de 0,81 g ácido láctico %; extrato seco total de 17,50%; gordura total de 0,2%; proteína total de 3,9%; cinzas de 1,04 % e carboidratos totais de 12,36%. O pH e a acidez das bebidas estão similares aos observados normalmente em leites fermentados em torno de 4,7 de pH e acidez de 0,81 g de ácido láctico/100g, respectivamente.

3.4.1. Avaliação sensorial

O produto obteve mais de 75% de aceitação para todos os atributos avaliados, sendo que 53,3% dos consumidores demonstraram atitude positiva quanto à intenção de compra. Quanto à aceitabilidade do produto de modo global e em particular da aparência, sabor e consistência, verifica-se que a amostra obteve médias situadas entre “gostei muito” e “gostei”.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

Em relação aos atributos avaliados com a escala do ideal, a cor do produto e a acidez obtiveram médias próximas ao ideal. As médias quanto ao sabor de frutas vermelhas, à doçura e à consistência situaram-se entre “um pouco menos intenso/ um pouco menos doce/ um pouco menos consistente do que eu gosto” e “do jeito que eu gosto”. Quanto à cor, 40% dos consumidores a julgaram mais clara do que o ideal. Mais de 20% dos consumidores julgaram a amostra com acidez mais intensa, sabor de frutas menos intenso, menos doce e menos consistente que o ideal. Para os atributos acidez e doçura mais de 65% dos consumidores julgaram que a intensidade estava ideal.

4 CONCLUSÃO

O probiótico selecionado para elaboração do leite fermentado com polpa de frutas vermelhas foi o *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* (Howaru Bifido HN 019), sem microencapsulação, por apresentar maior viabilidade inicial e durante a estocagem refrigerada (8 log UFC/g), superior a viabilidade dos probióticos microencapsulados (5-6 log UFC/g), devido ao rendimento das células viáveis observado após a secagem.

As contagens de probióticos das bifidobactérias se mantiveram estáveis durante 30 dias de estocagem refrigerada, apesar do pH e acidez desfavoráveis e em conformidade com a legislação para alimentos funcionais. Portanto, o probiótico Howaru Bifido (*lactis* HN 019), se mostrou apropriado no leite fermentado com polpa de frutas vermelhas.

Mais de 75% dos consumidores gostaram do leite fermentado com polpa de frutas vermelhas, com 53,3% de atitude positiva para intenção de compra.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa e financiamento do projeto.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNAN, N.T.; BORZA, A.D.; HANSEN, T. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiótico *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. **Food Research International**. v. 41, p. 184-193, 2007.

ANVISA, 2008. Comissões Tecnocientíficas de Acessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos: lista das alegações aprovadas. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm> Acesso em: 15/02/14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Instrução Normativa 68 de 12/12/2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. V - Métodos quantitativos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 2006.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Brasília- DF, 2007. Acessado em 23 junho 2014. Online. Disponível em: www.agricultura.gov.br/sislegis.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

GALLINA, D. A.; ANTUNES, A. E. C.; AZAMBUJA-FERREIRA, N. C.; MENDONÇA, J. B.; NORBONA, R. A. Caracterização de bebida obtida a partir de leite fermentado simbiótico adicionado de polpa de goiaba e avaliação da viabilidade das bifidobactérias. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, maio/junho, nº 386, v. 67, p. 45-54, 2012.

HORWITZ, W., *Official Methods of Analysis of AOAC International* 17th Ed., 2000, Vol. II. Food Composition; Additives; Natural Contaminants, chap 33 p.10; 54; 61; 71. (Proc. 920.108; 930.30; 935.42; 945.46).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. *Determination of the total nitrogen content of milk by Kjeldahl method*. Brussels: FIL/IDF, 1993. 11p.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation of *Lactobacillus lactis* with cross-linked gelatin membranes. *Journal Chemistry Technology Biotechnology*, v. 56, p. 259-263, 1993.

KRUPA, H.; JANA ATANU, H.; PATEL, H. *African Journal of Food Science*. Vol. 5, nº 16, pp. 817-832, 2011.

MAUS J. E.; INGHAM S. C. Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold- and acid-tolerance of bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*. v. 95, p. 146–154, 2003.

REDDY, KBOK; MADHU, NA, PRAPULLA, SG. Comparative survival and evaluation of functional probiotic properties of spray-dried lactic acid bacteria. *International Journal of Dairy Technology*. V. 62, n2, p.240-248, 2009.

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

TECHNICAL BULLETIN P –12. Alternative method for enumeration of Bifidobacteria in fermented milk products. – Guidelines. Chr-Hansen, 2007.

WEHR, H. M.; FRANK, J. F. *Standard Methods for the examination of Dairy Products*. 17th edition. APHA-American Public Health Association. Washington, EUA. 2004. 570 p.