

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS**

**ELABORAÇÃO DE DOCE DE LEITE *LIGHT*  
CONTENDO PROBIÓTICOS MICROENCAPSULADOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Caroline Posser Simeoni**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**



# **ELABORAÇÃO DE DOCE DE LEITE *LIGHT* CONTENDO PROBIÓTICOS MICROENCAPSULADOS**

**Caroline Posser Simeoni**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Qualidade de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.**

**Orientadora: Prof.a Dr.a Leadir Lucy Martins Fries**

**Co-orientador: Prof. Dr. Cristiano Ragagnin de Menezes**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Simeoni, Caroline Posser  
Elaboração de doce de leite light contendo probióticos microencapsulados. / Caroline Posser Simeoni.-2015.  
123 p.; 30cm

Orientadora: Leadir Lucy Martins Fries  
Coorientador: Cristano Ragagnin de Menezes  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2015

1. Alimento funcional 2. Microencapsulação 3. Simbióticos I. Fries, Leadir Lucy Martins II. Menezes, Cristano Ragagnin de III. Título.

---

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Caroline Posser Simeoni. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: carol.posser@hotmail.com

---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**ELABORAÇÃO DE DOCE DE LEITE *LIGHT* CONTENDO  
PROBIÓTICOS MICROENCAPSULADOS**

elaborada por  
**Caroline Posser Simeoni**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Leadir Lucy Martins Fries, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Ernesto Hashime Kubota , Dr. (UFSM)**

---

**Cristiane Franco Codevilla, Dra. (UFRGS)**

Santa Maria, 31 de agosto de 2015.



"Não desista enquanto você ainda for capaz de fazer um esforço a mais. É nesse algo a mais que está a sua vitória."

Roberto Shinyashiki





## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Universidade Federal de Santa Maria pelo ensino e infraestrutura de qualidade e ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização do Mestrado.

À Professora Leadir e Professor Cristiano por acreditarem no meu potencial e disponibilizarem seu tempo para minha orientação.

Obrigada à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço a minha Mãe, Rose Mari Posser Simeoni, ao meu Pai, Geloar Antônio Simeoni, pelos valores e pela educação que me ensinaram, pelo apoio e incentivo em todos os momentos, pois tudo que sou hoje devo a vocês. Agradeço também a minha irmã, Stefani Posser Simeoni, que mesmo não estando mais aqui conosco, está sempre iluminando meu caminho.

Agradeço às colegas de pós-graduação, de laboratório e amigas, Ana Paula Burin, Maria Fernanda Cáceres de Menezes e Mariana Etchepare “por não medirem esforços para que esse trabalho pudesse ser concluído” e que sempre estiveram do meu lado me apoiando. Obrigada Ana, obrigada por ser essa amiga e colega tão prestativa e solícita, sempre dedicada e pronta a ajudar no experimento sempre que foi preciso. Tua insistência valeu a pena!

Também deixo aqui meu agradecimento a toda equipe de colaboradores do Laboratório de Micropartículas, em especial a Gabriela, Greice e Luiza, que sempre deram apoio e participaram da execução do projeto.

À Ciandra Ferreira, Cinara Ferreira e Laura Hoffmann meu muito obrigado por sempre me receberem de braços abertos e disponibilizarem suas casas para mim. A minha amiga Fabrícia Dalabona, obrigada por ser essa amiga para todas as horas, pelos conselhos e incentivo no andamento do mestrado. Ao meu namorado Cristiano Caye agradeço o carinho, a compreensão e a paciência. Obrigada por me apoiar em todos os momentos. Amo muito vocês!

Muito obrigada aos colegas de trabalho, Gisele C. Branco e Gustavo Brunet Oliveira por entenderem e permitirem que me ausentasse das minhas obrigações em alguns momentos, em prol da minha formação.

Obrigada a todos que de qualquer forma contribuíram para a conclusão desse trabalho.



## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos  
Universidade Federal de Santa Maria

### ELABORAÇÃO DE DOCE DE LEITE *LIGHT* CONTENDO PROBIÓTICOS MICROENCAPSULADOS

AUTORA: CAROLINE POSSER SIMEONI

ORIENTADOR: LEADIR LUCY FRIES

CO-ORIENTADOR: CRISTIANO RAGAGNIN DE MENEZES

Data e local da defesa: Santa Maria, 31 de agosto de 2015.

O doce de leite é um produto típico da América Latina, principalmente do Brasil, Argentina e Uruguai e muito apreciado pelos consumidores devido as suas características sensoriais. No entanto, esse produto possui um elevado valor energético devido às altas concentrações de açúcar e gordura. Com a crescente preocupação dos consumidores em ingerir alimentos saudáveis, com baixo valor calórico e que proporcionem benefícios à saúde, esse trabalho buscou desenvolver um doce de leite *light* com adição do probiótico *Enterococcus faecium* microencapsulado. As microcápsulas foram elaboradas através do método de gelificação iônica externa por extrusão e receberam sobrecamada de concentrado proteico de soro do leite (WPC) na concentração de 0,5% e 2%. Foram realizadas análises de resistência térmica, resistência gastrointestinal *in vitro*, teor de proteína, atividade de água, umidade e morfologia. O doce de leite foi elaborado com leite desnatado, com 0,5% de gordura, substituição de 20% da sacarose por sucralose, adição de 3% de inulina e microcápsulas probióticas com diferentes concentrações de WPC na sobrecamada. No tratamento controle (C) foi adicionado cultura livre de *E. faecium*. O doce de leite foi monitorado por 90 dias, armazenado a 4 °C e, durante esse período foram analisadas a viabilidade do probiótico, a microbiologia do doce e os padrões de cor e textura no decorrer da vida de prateleira. Observou-se que as microcápsulas apresentaram formato e tamanho ideais para serem adicionadas em alimentos e ao mesmo tempo conferir proteção ao probiótico. O valor de proteína das cápsulas foi significativamente diferente entre os tratamentos, variando de 0,49% a 7,16% de proteína adsorvida na microcápsula. As microcápsulas também conferiram proteção térmica à célula probiótica em testes *in vitro*. Os microrganismos microencapsulados apresentaram contagens de 8,21 e 9,28 Log UFC·mL<sup>-1</sup> para os tratamentos com sobrecamada de 0,5% e 2% de WPC, respectivamente, enquanto que as células livres apresentaram viabilidade de somente 0,10 Log UFC·mL<sup>-1</sup> após aquecimento a 70 °C por 30 min. Quanto à viabilidade da cepa probiótica, podemos concluir que a microencapsulação influenciou significativamente a sobrevivência do probiótico, uma vez que as bactérias que foram microencapsuladas obtiveram viabilidade no final da vida de prateleira do produto acima de 7 Log UFC·g<sup>-1</sup>, enquanto que os probióticos que não receberam a microcápsula não tiveram viabilidade no produto, até o final do período de estocagem. No entanto, a porcentagem de proteína adicionada na microcápsula não interferiu na sobrevivência do probiótico. Os resultados da substituição da sacarose por sucralose e da gordura por inulina mostraram redução no valor calórico do doce de leite. Os resultados da análise microbiológica demonstraram redução significativa da contagem de *S. aureus* coagulase positiva e bolores e leveduras durante o tempo de estocagem do produto. Os resultados de textura para os parâmetros dureza, adesividade, gomosidade e flexibilidade variaram entre os tratamentos e no decorrer do tempo de vida de prateleira. Na análise da cor do doce de leite foi observada uma variação significativa no parâmetro luminosidade e na intensidade de amarelo (b\*), entre o tratamento sem as microcápsulas e os tratamentos adicionados das mesmas. Desse modo, foi possível elaborar um doce de leite *light* com probióticos microencapsulados através da substituição da sacarose e da gordura e da utilização da tecnologia de microencapsulação para conferir resistência e viabilidade às células probióticas até o final da vida de prateleira do produto.

**Palavras-chave:** Alimento funcional. Microencapsulação. Simbióticos.



## ABSTRACT

Master Dissertation  
Post Graduate Program on Food Science and Technology  
Federal University of Santa Maria

### PREPARATION OF LOW FAT DULCE DE LECHE CONTAINING MICROENCAPSULATED PROBIOTICS

AUTHOR: CAROLINE POSSER SIMEONI

ADVISER: LEADIR LUCY FRIES

CO-ADVISER: CRISTIANO RAGAGNIN DE MENEZES

Date and Defense Place: Santa Maria, 31 de august de 2015.

The dulce de leche is a typical product from Latin America, mainly in Brazil, Argentina and Uruguay. It's a product very appreciated by consumers because of its sensorial characteristics despite its high energy values. With the growing concern of the costumers in having healthy and low calories products which brings benefits to their health, this project aimed to develop a low fat dulce de leche adding microencapsulated *Enterococcus faecium* probiotics. The microcapsules were elaborated through the external ionic gelling by extrusion and they've received a protein recover of whey milk protein concentrate (WPC) of 0,5% and 2%. In the control Treatment were added free culture of *E. faecium*. The thermal resistance, gastrointestinal resistance in vitro, protein rate water activity and morphology were analyzed. The dulce de leche was prepared with skim milk with 0.5% fat , replacing 20% of sacorose by sucralose, adding 3% inulin and probiotic microcapsules whit differents overcoat WPC concentrations. The dulce de leche was monitored during 90 days stored at 4 °C. During this period it were analysed the viability of the probiotic, the microbiology of the product and the color and texture patterns while in the shelf. The microcapsules have the ideal shape and size to be added in the food and at the same time grant protection to the probiotic. The value of the capsules were significantly different among the treatments, ranging from 0,49% to 7,16% of protein adsorbed in the microcapsule. The microcapsules also granted thermal protection to the probiotic cells in the in vitro tests. The microencapsulated microorganisms presented countings of 8,21 and 9,28 Log UFC·mL<sup>-1</sup> to the treatments with an overlay of 0,5% and 2% of WPC respectively, while the free cells presented a viability of only 0,10 Log UFC·mL<sup>-1</sup> after a heating of 70 °C during 30 min. Therefore, about the viability of the probiotic strain, we can conclude that the microencapsulation influenced significantly the surviving of the probiotic, once the bacteria which have received the microcapsule had a viability at the end of its life in shelf above 7 Log UFC·g<sup>-1</sup> of the product, while the probiotics which haven't received the microcapsule haven't had the viability of the product at the end of its period of storage. However, the percentage of protein added to the microcapsule hasn't interfered in the survival of the bacterial strain. The results of the microbiological analysis have shown a significant reduction of positive *S. aureus* coagulase, moulds and yeasts during the storage of the product. The results found show that the substitution of the sucrose by sucralose and the fat by inulin reduced the caloric value of the dulce de leche. The texture results for hardness parameters, adhesiveness, gumminess and flexibility differed among the treatments during its life in shelf. In the analysis of the dulce de leche color we could notice a significant variant in the lightness parameter between the treatment without the microcapsules and the treatments that they were added. With these results we can conclude that it's possible to formulate low fat dulce de leche with probiotics throught the substitution of the sucrose and fat and using a microencapsulation to grant consistence and viability to the probiotic cells until the end of the product's life in shelf.

**Key-words:** Functional food. Microencapsulation. Symbiotics.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Microencapsulação por gelificação iônica através da técnica de extrusão. ....	43
Figura 2 –	Estrutura química do alginato com grupos de ácido L - gulurônico (G) e grupos de ácido D - manurônico (M). ....	45
Figura 3 –	Estrutura tridimensional do hidrogel de alginato, com interações entre íons $\text{Ca}^{2+}$ e os grupos carboxílicos do alginato. ....	45
Figura 4 –	Equipamento de extrusão/atomização utilizado para elaboração das microcápsulas probióticas. ....	52
Figura 5 –	Microscópio óptico com câmara digital acoplada para registro das microfotografias. ....	55
Figura 6 –	Fluxograma de produção do doce de leite <i>light</i> . ....	57
Figura 7 –	Texturômetro (A) e colorímetro (B) utilizados na análise de textura e de cor do doce de leite <i>light</i> com adição de sucralose, inulina e microcápsulas probióticas. ....	60
Figura 8 –	Microcápsulas dos tratamentos T0%, T0,5% e T2% (da esquerda para a direita) obtidas por gelificação iônica através de bico extrusor de 3 $\mu\text{m}$ . ....	66
Figura 9 –	Imagens de microscopia óptica (200x) das microcápsulas com sobrecamada de 0,5% de WPC, contendo <i>E. faecium</i> , após 120 minutos de exposição ao ambiente gastrointestinal simulado <i>in vitro</i> , em pH 2,5 (A) e pH 7,5 (B). ....	70
Figura 10 –	Imagens de microscopia óptica (200x) das microcápsulas com sobrecamada de 2,0% de WPC, contendo <i>E. faecium</i> , após 120 minutos de exposição ao ambiente gastrointestinal simulado <i>in vitro</i> , em pH 2,5 (A) e em pH 7,5(B). ....	71
Figura 11 –	Imagens de microscopia óptica (200x) das microcápsulas sem sobrecamada de WPC, contendo <i>E. faecium</i> , após 120 minutos de exposição ao ambiente gastrointestinal simulado <i>in vitro</i> , em pH 2,5 (A) e pH 7,5 (B). ....	72
Figura 12 –	Imagens de microscopia óptica (1000x) das microcápsulas contendo <i>E. faecium</i> livre, após 120 minutos de exposição ao ambiente gastrointestinal simulado <i>in vitro</i> , em pH 2,5 (A) e pH 7,5 (B). ....	72
Figura 13 –	Imagens de microscopia óptica (1000x) das microcápsulas contendo <i>E. faecium</i> , após a liberação em tampão fosfato pH 7,5. ....	73
Figura 14 –	Microfotografia óptica das microcápsula de alginato de sódio contendo <i>E. faecium</i> , sem sobrecamada de WPC em aumento de 400 vezes, (A) e 200 vezes (B). ....	75
Figura 15 –	Microfotografia óptica das microcápsulas de alginato de sódio contendo <i>E. faecium</i> , com sobrecamada de 0,5% de WPC em aumento de 400 vezes (A) e 200 vezes (B). ....	76
Figura 16 –	Microfotografia óptica das microcápsulas de alginato de sódio contendo <i>E. faecium</i> , com sobrecamada de 2,0% de WPC em aumento de 400 vezes (A) e 200 vezes (B). ....	76

Figura 17 – Microfotografia de microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas do tratamento T0%, sem a sobrecamada de WPC, em aumento de 750 vezes (A) e 400 vezes (B). .....	77
Figura 18 – Microfotografia de microscopia eletrônica de varredura de microcápsulas do tratamento T0,5%, com sobrecamada de 0,5% de WPC, em aumento de 150 vezes (A) e 1.200 vezes (B). .....	77
Figura 19 – Microfotografia de microscopia eletrônica de varredura de microcápsulas do tratamento T2%, com sobrecamada de 2,0% de WPC, em aumento de 170 vezes (A) e 1.100 vezes (B). .....	78
Figura 20 – Comparação da superfície das microcápsulas de alginato de sódio contendo <i>E. faecium</i> , dos tratamentos T0%, sem sobrecamada proteica (A), tratamento T0,5%, com sobrecamada de 0,5% de WPC (B) e tratamento T2%, com sobrecamada de 2,0% de WPC (C). .....	79
Figura 21 – Curva de distribuição média de tamanho das microcápsulas de alginato de sódio contendo <i>E. faecium</i> , do tratamento T0%, sem sobrecamada de WPC. ...	80
Figura 22 – Curva de distribuição média de tamanho das microcápsulas de alginato de sódio contendo <i>E. faecium</i> , do tratamento T0,5%, com sobrecamada de 0,5% de WPC. ....	81
Figura 23 – Curva de distribuição média de tamanho das microcápsulas de alginato de sódio contendo <i>E. faecium</i> , do tratamento T2%, com sobrecamada de 2,0% de WPC. ....	81
Figura 24 – Coloração do doce de leite <i>light</i> com adição de sucralose, inulina e microcápsulas probióticas no dia da fabricação (figura A) e no 60° dia de estocagem a 4°C (figura B). .....	100



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Requisitos físico-químicos do doce de leite.....	29
Tabela 2 – Tabela nutricional comparativa do leite de vaca e do doce de leite.....	29
Tabela 3 – Microrganismos probióticos regulamentados pela ANVISA para aplicação em alimentos. ....	37
Tabela 4 – Composição química do concentrado proteico do soro de leite (WPC). ....	50
Tabela 5 – Análise de proteína adsorvida na microcápsula elaborada com alginato de sódio de baixa viscosidade, com e sem sobrecamada de WPC, através da técnica de gelificação iônica. ....	63
Tabela 6 – Análise de atividade de água e umidade das microcápsulas elaboradas com alginato de sódio de baixa viscosidade, com e sem sobrecamada de WPC, através da técnica de gelificação iônica. ....	65
Tabela 7 – Viabilidade de <i>Enterococcus faecium</i> microencapsulados (Log UFC·g <sup>-1</sup> ), após aquecimento a 70 °C por 0, 15, 20 e 30 minutos. ....	67
Tabela 8 – Viabilidade probiótica (Log UFC·mL <sup>-1</sup> ) de <i>Enterococcus faecium</i> microencapsulados com alginato de sódio, com e sem sobrecamada de concentrado proteico do soro de leite, durante o teste de resistência gastrointestinal <i>in vitro</i> . ....	68
Tabela 9 – Análise do leite desnatado utilizado na fabricação do doce de leite <i>light</i> .....	83
Tabela 10 – Rendimento doce de leite <i>light</i> contendo <i>E. faecium</i> livre e microencapsulado, com sobrecamada de concentrado proteico de soro de leite (WPC).....	83
Tabela 11 – Composição bromatológica do doce de leite <i>light</i> contendo <i>E. faecium</i> livre ou microencapsulado, com sobrecamada de concentrado proteico de soro de leite (WPC).....	84
Tabela 12 – Viabilidade dos microrganismos probióticos livres ou microencapsulados, com sobrecamada de concentrado proteico de soro de leite (WPC), no doce de leite <i>light</i> armazenado por 90 dias a 4 °C.....	89
Tabela 13 – Contagem de <i>S. aureus</i> coagulase positiva, expresso em Log UFC·g <sup>-1</sup> , durante a vida de prateleira do doce de leite <i>light</i> contendo <i>E. faecium</i> livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC, armazenado a 4 °C.....	92
Tabela 14 – Contagem de bolores e leveduras, expresso em Log UFC·g <sup>-1</sup> , durante a vida de prateleira do doce de leite <i>light</i> contendo <i>E. faecium</i> livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC, armazenado a 4 °C.....	92
Tabela 15 – Perfil de textura para o parâmetro dureza do doce de leite <i>light</i> contendo <i>E. faecium</i> livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC durante os 90 dias de armazenamento, a 4 °C.....	95
Tabela 16 – Perfil de textura para o parâmetro coesividade do doce de leite <i>light</i> contendo <i>E. faecium</i> livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC durante os 90 dias de armazenamento, a 4 °C.....	95

Tabela 17 – Perfil de textura para o parâmetro flexibilidade do doce de leite <i>light</i> contendo <i>E. faecium</i> livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC durante os 90 dias de armazenamento, a 4 °C.....	96
Tabela 18 – Perfil de textura para o parâmetro adesividade do doce de leite <i>light</i> contendo <i>E. faecium</i> livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC, durante os 90 dias de armazenamento a 4 °C .....	97
Tabela 19 – Perfil de textura para o parâmetro gomosidade do doce de leite <i>light</i> contendo <i>E. faecium</i> livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC, durante os 90 dias de armazenamento a 4 °C.....	98
Tabela 20 – Perfil de luminosidade (L*) do doce de leite <i>light</i> contendo <i>E. faecium</i> livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC, durante 90 dias de armazenamento a 4 °C .....	99
Tabela 21 – Perfil de intensidade de amarelo (b*) do doce de leite <i>light</i> contendo <i>E. faecium</i> livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC, durante 90 dias de armazenamento a 4 °C .....	101

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Formulações do doce de leite <i>light</i> nos tratamentos adicionados de <i>Enterococcus faecium</i> na forma de célula livre (C) e microencapsulados com sobrecamada de 0,5% (T0,5%) e 2% (T2%) de concentrado proteico do soro do leite .....	56
--	----



## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{m}$	– Micrômetros
ALA	– Alfa-lactoalbumina
ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	– <i>Association of Official Analytical Chemists</i>
Aa	– Atividade de água
b.p.f	– Boas Práticas de Fabricação
BHI	– <i>Brain Heart Infusion</i>
BLG	– Beta-lactoglobulina
BS	– Soroalbumina
C	– Célula Livre
Ca	– Cálcio
cm	– Centímetros
CV	– Coeficiente de Variação
D0	– Dia zero
D15	– Dia quinze
D30	– Dia trinta
D45	– Dia quarente e cinco
D60	– Dia sessenta
D75	– Dia setenta e cinco
D90	– Dia noventa
$\text{dm}^2$	– Decímetro quadrado
DP	– Desvio Padrão
EP	– Erro Padrão
Esp./Estab.	– Espessante/Estabilizante
EUA	– Estados Unidos da América
FDA	– <i>Food and Drug Administration</i>
g	– Gramas
GMP	– Glicomacropéptídeos
h	– Horas
HCl	– Ácido Clorídrico
Ig's	– Imunoglobulinas
IPS	– Isolado Proteico do Soro
K	– Potássio
Kcal	– Quilocalorias
kDa	– Kilodalton
Kg	– Quilogramas
kV	– Quilovolt
L	– Litros
Log	– Logarítmo
M.E.V.	– Microscopia Eletrônica de Varredura
Máx.	– Máximo

mg	– Miligramas
Mín.	– Mínimo
min.	– Minutos
mL	– Mililitros
mm	– Milímetros
MRS	– Man, Rogosa e Sharpe
N	– Número de células viáveis nas cápsulas
Na	– Sódio
NaCl	– Cloreto de Sódio
No	– Número de células viáveis na solução de alimentação
°C	– Graus Celsius
P	– Significância
Pa.s	– Pascal por segundo
pH	– Potencia de hidrogênio
pKa	– Constante de dissociação ácida
ppm	– Parte por milhão
psi	– <i>Pounds per square inch</i>
Qtde.	– Quantidade
RM	– Rendimento da Microencapsulação
RNA	– Ácido ribonucleico
RPM	– Rotações por minuto
RS	– Rio Grande do Sul
SAS	– <i>Statistical Analysis System</i>
T0	– Tempo zero
T0%	– Tratamento sem sobrecamada
T0,5%	– Tratamento com sobrecamada de 0,5% de WPC
T15	– Tempo quinze
T2%	– Tratamento com sobrecamada de 2% de WPC
T20	– Tempo vinte
T30	– Tempo trinta
Trat.	– Tratamento
UFC	– Unidade Formadora de Colônia
UHT	– <i>Ultra High Temperature</i>
UV	– Ultravioleta
VRBG	– Ágar Vermelho Violeta Bile com Glicose
WHO	– <i>World and Health Organization</i>
WPC	– Concentrado Proteico do Soro do Leite

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>1.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	24
<b>1.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	24
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	27
<b>2.1</b>	<b>Doce de leite</b> .....	27
2.1.1	Sucralose .....	30
<b>2.2</b>	<b>Alimentos simbióticos e funcionais</b> .....	32
2.2.1	Prebióticos .....	34
2.2.1.1	Inulina.....	35
2.2.2	Probióticos.....	36
2.2.2.1	<i>Enterococcus faecium</i> .....	39
<b>2.3</b>	<b>Microencapsulação</b> .....	41
2.3.1	Alginato .....	44
2.3.2	Concentrado proteico de soro do leite (WPC).....	48
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	51
<b>3.1</b>	<b>Elaboração das microcápsulas probióticas</b> .....	51
<b>3.2</b>	<b>Eficiência da microencapsulação</b> .....	53
<b>3.3</b>	<b>Capacidade termotolerante das microcápsulas probióticas contendo <i>E. faecium</i></b> .....	54
<b>3.4</b>	<b>Teste de resistência <i>in vitro</i> das microcápsulas probióticas contendo <i>E. faecium</i> às condições gastrointestinais</b> .....	54
<b>3.5</b>	<b>Análise morfológica das microcápsulas probióticas contendo <i>E. faecium</i></b> .....	54
<b>3.6</b>	<b>Preparo do doce de leite <i>light</i> adicionado de <i>E. faecium</i> microencapsulados com sobrecamada de WPC</b> .....	55
<b>3.7</b>	<b>Viabilidade do probiótico <i>E. faecium</i> durante a vida do doce de leite <i>light</i></b> .....	58
<b>3.8</b>	<b>Análise microbiológica do doce de leite <i>light</i> contendo <i>E. faecium</i> livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC</b> .....	58
<b>3.9</b>	<b>Análises físico-químicas do doce de leite <i>light</i> contendo <i>E. faecium</i> livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC</b> .....	59
<b>3.10</b>	<b>Análise estatística</b> .....	60
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	63
<b>4.1</b>	<b>Composição química das microcápsulas probióticas contendo <i>E. faecium</i></b> .....	63
<b>4.2</b>	<b>Eficiência da microencapsulação</b> .....	65
<b>4.3</b>	<b>Capacidade termotolerante das microcápsulas probióticas contendo <i>E. faecium</i></b> .....	67
<b>4.4</b>	<b>Teste de resistência <i>in vitro</i> das microcápsulas probióticas contendo <i>E. faecium</i> às condições gastrointestinais</b> .....	68
<b>4.5</b>	<b>Análise morfológica das microcápsulas probióticas contendo <i>E. faecium</i></b> .....	74
4.5.1	Microscopia óptica .....	74
4.5.2	Microscopia eletrônica de varredura (M.E.V).....	76
4.5.3	Tamanho das microcápsulas probióticas .....	79
<b>4.6</b>	<b>Rendimento e composição química do doce de leite <i>light</i> contendo <i>E. faecium</i> livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC</b> .....	82
<b>4.7</b>	<b>Viabilidade do probiótico <i>E. faecium</i> durante a vida de prateleira do doce de leite <i>light</i></b> .....	88

4.8	Análise microbiológica do doce de leite <i>light</i> contendo <i>E. faecium</i> livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC .....	90
4.9	Perfil de textura do doce de leite <i>light</i> contendo <i>E. faecium</i> livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC .....	94
4.10	Perfil de cor do doce de leite <i>light</i> contendo <i>E. faecium</i> livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC .....	98
5	CONCLUSÕES .....	103
5.1	Sugestões .....	103
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	105



# 1 INTRODUÇÃO

A tendência crescente do consumo de produtos *diet* e *light* no mercado tem sido observada devido, principalmente, à postura dos consumidores, que estão mais conscientes da direta relação entre boa alimentação e saúde (GOMES et al., 2007).

A produção de alimentos funcionais e simbióticos, contendo bactérias probióticas é outra área que vêm ganhando destaque na indústria nos últimos anos, devido à procura por alimentos que proporcionem benefícios a saúde quando ingeridos pelos consumidores (BURGAIN et al., 2011; SIMEONI et al., 2014).

Os simbióticos consistem na combinação de pré e probióticos, onde o componente prebiótico visa promover o crescimento ou melhorar o desempenho do componente probiótico, criando efeito sinérgico contribuindo para a saúde do hospedeiro (SCHEREZENMEIR; VERSE, 2001). Os prebióticos são polissacarídeos como lactulose, inulina, oligofrutoses entre outros, que não podem ser digeridos pelos seres humanos, mas que podem ser fermentado por bactérias, sendo portanto, utilizados para promover seletivamente o crescimento de certos probióticos. Bactérias probióticas têm sido incorporadas em uma grande variedade de alimentos como: iogurtes, queijos, sorvetes, sucos, chocolates, cereais e produtos cárneos (ANAL; SINGH, 2007; MENEZES et al., 2013).

Microrganismos probióticos, quando empregados em alimentos com alegação de propriedade funcional, devem apresentar resistência às operações de processamento e viabilidade durante o período de armazenamento do produto (AKIN et al., 2007). Estes microrganismos devem estar presentes no produto em concentração significativa e, para que ocorra ação benéfica no intestino, devem ser capazes de sobreviver à acidez estomacal e aos sais biliares (CHAMPAGNE et al., 2011).

Para tanto, pesquisas têm demonstrado que as culturas probióticas podem ser significativamente protegidas através da técnica de microencapsulação. Diversos estudos já demonstraram que a proteção de microrganismos em cápsulas de alginato, obtidas por gelificação iônica externa, resultam no aumento da sobrevivência dos probióticos em diversos alimentos e também durante o trânsito intestinal (ANNAN; BORZA; TRUELSTRUP-HANSEN, 2008; KAILASAPATHY, 2009; SIMEONI et al., 2014;).

Com o avanço das pesquisas em alimentos funcionais, tornou-se importante desenvolver novas matrizes para veicular os probióticos, que ainda não tenham sido usadas industrialmente. Além disso, testar ingredientes, reformular processos e produtos, aumentar o

número de produtos funcionais no mercado e oferecer novas opções, nutritivas e saborosas, para todos os tipos de demanda. Portanto, é interessante incluir cepas probióticas em alimentos e bebidas que fazem parte de uma dieta normal, para melhorar a saúde do consumidor, enquanto se desfruta de refeições saborosas (COMAN et al., 2012).

Pensando em um alimento saboroso e atrativo, o doce de leite, um produto lácteo típico da América Latina, altamente consumido no Brasil, Argentina e Uruguai e que vem ganhando popularidade na Europa e Estados Unidos (PAULETTI et al., 1992; PAVLOVIC et al., 1992) é uma alternativa interessante de alimento funcional. No entanto esse produto contém altas taxas de açúcares, gorduras e elevado valor calórico (GARCÍA; CARDONA, 2008). Talvez por esses motivos, seu consumo se torna um pouco restrito.

A disseminação de informações que relacionam alimentos com doenças crônicas, bem como com a saúde e com a longevidade, levou os consumidores a se conscientizarem sobre a importância de ter uma alimentação saudável. Historicamente, o estado nutricional da população mundial é afetado pelas altas ingestões de sal, açúcar, gorduras saturadas e gorduras *trans*, que são os principais hábitos alimentares associados às doenças crônico-degenerativas. Portanto, a tendência é que produtos tradicionalmente ricos em calorias, gorduras e açúcares sejam gradualmente substituídos por linhas *light*, *diet* e por alimentos funcionais (GUIMARÃES et al., 2012a; KAILASAPATHY, 2009).

Levando-se em conta o cenário atual do mercado e a procura por alimentos saudáveis, o doce de leite *light* com adição de probióticos microencapsulados pode ser uma matriz inovadora e interessante por possuir um apelo saudável e funcional ao mesmo tempo de ser um alimento que é bastante popular e apreciado pelos consumidores.

### **1.1 Objetivo geral**

- Elaborar um doce de leite *light* contendo probióticos microencapsulados, buscando obter um produto funcional e de baixo valor energético.

### **1.2 Objetivos específicos**

- Elaborar microcápsulas com *Enterococcus faecium* para serem adicionadas ao doce de leite *light*;
- Caracterizar a composição e morfologia das microcápsulas;

- Testar a viabilidade *in vitro* das microcápsulas quanto à resistência térmica e as condições gastrointestinais;
- Elaborar o doce de leite com substituição parcial da sacarose por sucralose, da gordura por inulina e adição do probiótico *Enterococcus faecium* microencapsulado;
- Avaliar as características físico-químicas do produto elaborado;
- Avaliar a viabilidade do probiótico no doce de leite *light* durante 90 dias.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Doce de leite

A ampla comercialização do doce de leite nos países latinos, principalmente Argentina, Brasil e Uruguai (PAVLOVIC et al., 1992) já é conhecida. Entretanto, esse produto possui um potencial de exportação promissor, uma vez que os países da Europa e América do Norte não o produzem (PAULETTI et al., 1992; DEMIATE; KONKEL; PEDROSO, 2001).

De acordo com a legislação brasileira define-se doce de leite como o produto obtido por concentração e ação do calor a pressão normal ou reduzida do leite ou leite reconstituído, adicionado de sacarose (parcialmente substituída ou não por monossacarídeos e/ou outros dissacarídeos), com ou sem adição de sólidos de origem láctea e de outras substâncias alimentícias (BRASIL, 1997). De acordo com essa mesma legislação a porcentagem de sacarose é no máximo 30%, amidos ou amidos modificados são admitidos em proporção não superior a 0,5% sobre o volume de leite, assim como mono ou dissacarídeos que substituam a sacarose em no máximo 40%. Creme e sólidos de origem láctea também são tolerados como ingredientes opcionais, sendo proibida a adição de gordura ou proteína não láctea (BRASIL, 1997).

A incorporação de aditivos no doce de leite é permitida, no entanto a concentração não deverá ultrapassar o máximo permitido pelo Regulamento Técnico Específico (BRASIL, 1997). É importante ressaltar que o doce que contenha os aditivos espessantes, estabilizantes ou umectantes deve denominar-se “doce de leite para confeitaria”.

Entretanto, a falta de informações técnicas sobre o emprego de outros ingredientes como os espessantes, na tecnologia de fabricação, bem como seus reais efeitos sobre as características do doce de leite, são fatores que dificultam a obtenção de doces de qualidade. Esse fato cria um cenário de descaracterização do produto, o que limita o desenvolvimento de novas tecnologias e processos de produção (PERRONE et al., 2011).

Dados sobre a produção de doce de leite no Brasil são escassos, o que impossibilita a determinação da quantidade total produzida e consumida. Estima-se que sua produção represente aproximadamente 0,6% da quantidade total de produtos em um laticínio. Minas Gerais detém aproximadamente 50% da produção brasileira de doce de leite, destacando-se como o principal produtor brasileiro. Segundo especialistas, alguns fatores limitam a evolução

da indústria do doce de leite, como a pequena capacidade de produção das indústrias e falta de padronização do produto (PERRONE et al., 2012).

Novos ingredientes têm sido investigados no processamento do doce de leite, para atender às exigências do mercado consumidor atual, que deseja produtos com qualidade sensorial e nutricional associada a benefícios para a saúde (PERRONE et al., 2011; COLOMBO et al., 2009). A inulina é um ingrediente que vem sendo utilizado no processamento de alimentos por apresentar propriedades prebióticas e melhorar aspectos sensoriais nos alimentos. Novas formulações de alimentos contendo inulina devem ser propostas para atender as exigências dos consumidores que desejam ingerir produtos saborosos e ao mesmo tempo saudáveis (VISSOTO; GOMES, 2005; MATSUBARA, 2001).

A textura do doce de leite também é influenciada quando há utilização de novos ingredientes ou substituição destes por outros. Os parâmetros avaliados na análise de textura são os seguintes (RAMOS; GOMIDE, 2007):

- Dureza: força necessária para produzir uma deformação na amostra;
- Coesividade: extensão que um material pode ser deformado antes da ruptura;
- Flexibilidade (elasticidade): velocidade que um material deformado volta ao normal depois de retirada a força deformadora;
- Adesividade: energia necessária para superar as forças atrativas entre a superfície do alimento e a de outros materiais com as quais o alimento está em contato;
- Gomosidade: energia requerida para desintegrar um alimento até estar pronto para a deglutição.

A tecnologia de fabricação do doce de leite consiste no aquecimento e evaporação do leite com a adição de sacarose, até adquirir uma consistência de pasta (GARCÍA; CARDONA, 2008). O controle do teor de umidade do produto final é realizado por meio da determinação do teor de sólidos solúveis, medido através do refratômetro. A determinação ocorre no final do processo de produção. Geralmente a evaporação do doce de leite pastoso é realizada até que se atinja uma concentração de sólidos solúveis totais de cerca de 71° Brix, determinado por refratômetro a 25 °C (GUIMARÃES et al., 2012a). O teor de lipídeos do doce de leite influencia diretamente o rendimento e a textura, e é definido por meio da padronização da gordura do leite. Segundo Perrone (CASTANHEIRA, 2012), o teor mínimo de gordura no leite para a fabricação de doce de leite tradicional é aproximadamente 2,6%.

Os requisitos físico-químicos do doce de leite também são regulamentados e os valores de referência estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 – Requisitos físico-químicos do doce de leite.

Componentes	Doce de leite
Umidade (%)	Máx. 30,0
Matéria Gorda (%)	6,0 a 9,0
Cinzas (%)	Máx. 2,0
Proteínas (%)	Mín. 5,0

Máx – Máximo, Mín - Mínimo

Fonte: BRASIL (1997).

Pelo fato de o doce de leite ser, basicamente, leite concentrado com adição de açúcar, esse alimento possui valor nutritivo considerável, como mostrado na Tabela 2, podendo contribuir com parcela das proteínas, carboidratos, vitaminas e calorias da dieta. Além disso, possui estabilidade microbiológica e uma excelente palatabilidade e aceitação do consumidor (GARCÍA; CARDONA, 2008).

Tabela 2 – Tabela nutricional comparativa do leite de vaca e do doce de leite.

Constituintes	Leite integral de vaca (100 mL)	Doce de leite (100 g)
Calorias (Kcal)	65	322
Umidade (g)	87,6	26,6
Proteína (g)	3,3	8,3
Lipídeos (g)	3,4	8,3
Lactose (g)	4,7	10,2
Outros açúcares (g)	0	45,3
Cinzas (g)	0,7	1,4
Cálcio (mg)	120	280
Fósforo (mg)	95	220
Ferro (mg)	0,05	0,20

Fonte: Martins e Lopes (1981).

Tecnologicamente o doce de leite se enquadra entre os produtos de leite conservados por evaporação e adição de açúcar, de modo que, em função da alta pressão osmótica criada, pode ser conservado em temperatura ambiente (MADRONA; ZOTARELLI; BRANCO, 2009).

A alta concentração de solutos resulta em umidade abaixo de 30%, teor de açúcar ao redor de 60% e atividade de água (Aa) abaixo de 0,85, principal fator de estabilidade microbiológica do produto (DEMIATE; KONKEL; PEDROSO, 2001). No entanto, essas características facilitam o aparecimento de arenosidade. Esse defeito é resultante da concentração da lactose e de sua saturação, formando cristais grandes de lactose, durante a

estocagem do produto. A cristalização no doce de leite é inevitável, tornando-se o principal limitante da vida útil do produto (CASTANHEIRA, 2012).

Segundo Demiate, Konkel e Pedroso (2001), o doce de leite não apresenta uniformidade bromatológica, pois a maioria das empresas que fabricam esse produto utilizam formulações e processos personalizados, o que acarreta diferenças consideráveis na composição química das diversas marcas, resultando na ausência de um padrão fixo (RICHARDS et al., 2007).

Buscando atender as tendências alimentares modernas, as indústrias estão buscando alternativas para tornar os alimentos mais saudáveis, com teores de gordura, e açúcares reduzidos e com baixo valor calórico. Para isso, novos ingredientes têm sido investigados no processamento do doce de leite como substitutos do açúcar e da gordura (PERRONE et al., 2011).

Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 1998), para um alimento ser considerado *light* é necessário reduzir em 25% o seu valor energético em comparação ao produto tradicional. Para isso, é possível substituir o açúcar por edulcorantes e reduzir o teor de gordura (MITTAL; BAJWA, 2012).

### 2.1.1 Sucralose

A sucralose foi originalmente aprovada para uso em alimentos no Canadá, em 1991. Somente em 1998 a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o seu uso em 15 categorias de alimentos e bebidas (FDA, 1998). Em 1999, a FDA expandiu o uso da sucralose para adoçante de uso geral, podendo ser usada como adoçante em todos os produtos de consumo (FDA, 1999).

Os edulcorantes apresentam ação adoçante, podendo substituir a sacarose. Alguns desses compostos são conhecidos como edulcorantes intensos, pois fornecem doçura acentuada, sendo utilizados em quantidades muito pequenas. Geralmente são não-nutritivos ou pouco calóricos. De acordo com Benassi, Watanabe e Lobo (2001), os edulcorantes não-nutritivos, ou seja, aqueles que não são metabolizados pelo organismo, não fornecendo energia são: a sacarina, cujo poder edulcorante é cerca de 300 vezes a da sacarose, porém revela frequentemente gosto amargo; o ciclamato, de 30 a 50 vezes mais doce que a sacarose, mas apresenta sabor residual agridoce desagradável; o acesulfame-K, cerca de 180 a 200 vezes mais doce do que a sacarose, tem perfil de doçura semelhante ao da glicose; e a sucralose, cujo poder edulcorante pode superar 400 a 800 vezes a sacarose.



A sucralose é derivada da sacarose por um processo no qual três grupos hidroxil são substituídos por três átomos de cloro (cloração da sacarose), produzindo uma substância muito estável (GRICE; GOLDSMITH, 2000). Sua natureza não tóxica, não cancerígena, não bioreativa, sem acumular em animais e seres humanos, suporta a segurança do uso da sucralose como um ingrediente alimentar para consumo humano (BRUSICK et al., 2010). Em estudos realizados com alimentos assados e cozidos foi demonstrada a estabilidade desse edulcorante (GROTZ; MUNRO, 2009). A sucralose exerce importante efeito sobre as características sensoriais (sabor e cor), físicas (viscosidade, cristalização), microbianas (conservação) e químicas (caramelização) do produto (BRANDS; VAN BOEKEL, 2001). Além disso, possui propriedades tecnológicas favoráveis para confecção de doces em pasta, tais como: alta estabilidade térmica, solubilidade em meio aquoso ou ácido e ausência de sabor residual amargo ou metálico (GUIMARÃES et al., 2012a).

De acordo com o *Codex Alimentarius* (2005), o uso de sucralose é permitido em um limite máximo de 300 ppm em bebidas lácteas saborizadas e fermentadas e 250 ppm para sobremesas e doces com base láctea, como sorvetes, pudins, mousse e outras.

Diversos estudos já desenvolveram doce de leite *light* utilizando a sucralose como substituto total ou parcial da sacarose, e obtiveram aceitação para o produto. Milagres et al. (2010) substituíram o açúcar por sucralose e ciclamato, sacarina e sorbitol. Guimarães et al. (2012a) utilizaram polidextrose e sucralose em diferentes concentrações como substitutos da sacarose e obtiveram aumento da qualidade nutricional do produto e boa aceitação. A adição desses dois componentes também aumentou o valor de fibra alimentar do produto. García; Cardona; Herrera (2008) utilizaram polidextrose, sorbitol e frutose em substituição de até 50% da sacarose e conseguiram redução de 38% de calorias. No entanto, Milagres et al., (2010) observou que o doce elaborado com sucralose apresentou diferenças estatísticas significantes no teor de sólidos solúveis, textura e sabor, se comparados com o doce elaborado com sacarose. O aumento na proporção de substituição da sacarose por sucralose no doce de leite aumentou o conteúdo de cinzas e a acidez do produto além de diminuir a consistência, requerendo assim algum aditivo espessante pra corrigir esse defeito (GUIMARÃES et al., 2012a).

É importante ressaltar que as formulações com teor de calorias reduzido são geralmente mais complexas e devem ser equilibradas para que o produto adquira consistência, sabor, doçura e rendimento semelhantes a da versão tradicional (GUIMARÃES et al., 2012a).

## 2.2 Alimentos simbióticos e funcionais

É evidente que tanto os alimentos *light* como os funcionais vêm ganhando popularidade entre os consumidores e têm um futuro promissor no mercado, devido à preocupação da população em ingerir alimentos que, além de suprir as necessidades nutricionais, tragam benefícios a saúde (BURGAIN et al., 2011). Uma pesquisa demonstrou que o interesse do consumidor em ingerir doce de leite funcional é alto. Cerca de 80,45% reportaram que consumiriam o novo produto por esse ser diferenciado (GUIMARÃES et al., 2012b). Muitos consumidores optam por versões mais saudáveis de produtos que eles já consomem, sendo incapazes ou relutantes em adaptar sua dieta aos guias dietéticos sugeridos (ARVANITOYANNIS; HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, 2005).

Essa preocupação com a saúde é perceptível e confirmada por pesquisa que mostra que quase 30% dos consumidores de doce de leite praticam atividades físicas de três a quatro vezes por semana e 46,37% consomem alimentos *light* e/ou *diet*. Estes resultados refletem a crescente preocupação dos consumidores quanto à saúde, à forma física e à qualidade de vida. Ainda, essa mesma pesquisa apontou que dos 88,83% indivíduos que consomem, regularmente, doce de leite tradicional possuem alguma desordem metabólica e/ou constipação intestinal, principalmente diabetes mellitus, hipertensão arterial e dislipidemias (GUIMARÃES et al., 2012b).

Os maiores mercados de produtos funcionais são os Estados Unidos, a Europa e o Japão. A estimativa de consumo de alimentos funcionais na Europa em 2006 foi de 15 bilhões de dólares e nos EUA, em 2009, foi de 25 bilhões de dólares. O Japão, país criador do conceito de alimentos funcionais possuía mais de 500 produtos funcionais em 2005 (SIRÓ et al., 2008). Estima-se que o mercado funcional brasileiro movimentou 1,9 bilhões de dólares em 2009, sendo os alimentos funcionais lácteos a principal categoria, responsável por 73% das vendas de funcionais (BENKOUIDER, 2005).

Alimentos que frequentemente são suplementados com probióticos são derivados lácteos como queijos, iogurtes, sorvetes, bebida láctea, leite fermentado entre outros (BURITI et al., 2005; BURITI; KOMATSU; SAAD, 2007; BURITI; CASTRO; SAAD, 2010; SOUZA; SAAD, 2009). Adicionalmente, a viabilidade desses microrganismos em alimentos como manjar branco (CORRÊA; CASTRO; SAAD, 2008), mousse de chocolate (ARAGON-ALEGRO et al., 2007; CARDARELLI et al., 2008) e mousse de maracujá (BURITI; KOMATSU; SAAD, 2007) tem sido estudada. No entanto, não foi encontrado na literatura trabalhos que relatam a adição de probióticos no doce de leite.

Para satisfazer o estilo de vida que a população vem buscando, o doce de leite pode ser incorporado de prebióticos e probióticos, a fim de torná-lo menos calórico, mais saudável e funcional para o consumidor. Desse modo, à medida que os produtos diferenciados vêm ganhando espaço nas gôndolas dos supermercados, a tendência é que os produtos tradicionais similares, ricos em calorias, gordura ou açúcares, sejam gradativamente substituídos (GUIMARÃES et al., 2012b).

No Brasil, a ANVISA (1999) usa a definição de “propriedade funcional” ao invés de “alimento funcional”, sendo a alegação relativa ao “papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não-nutriente, tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano”.

Os microrganismos probióticos podem ter sobrevivência maior no trato gastrointestinal caso seu substrato específico seja prontamente disponível para fermentação. Portanto, o consumo de simbiótico pode aumentar a população de bactérias probióticas do hospedeiro, tanto por ingerir os microrganismos, quanto por favorecer a sua multiplicação através dos prebióticos (GIBSON; ROBERFROID, 1995; SAAD, 2006). Esse efeito foi demonstrado em estudos que verificaram que a dieta com combinação simbiótica se mostrou mais eficaz do que as dietas de prebióticos e probióticos isoladas (LE LEU et al., 2009; WORTHLEY et al., 2009).

Os simbióticos, além de favorecer a sobrevivência do microrganismo no intestino do hospedeiro, contribui para a viabilidade probiótica no alimento. Isso provavelmente ocorre devido à interação entre eles antes do consumo, podendo, em alguns casos, resultar em uma vantagem competitiva para o probiótico. Por essa razão, é importante que a seleção do prebiótico e do probiótico possua sinergia (SAAD, 2006).

Ozer et al., (2005) verificaram que a adição de inulina e lactulose em um iogurte suplementado com *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus acidophilus* não afetou o crescimento das cepas características do produto, mas estimulou o crescimento de *B. bifidum* no produto. Akin (2005) verificou que a inulina estimulou o crescimento de *L. acidophilus* e *B. lactis* em sorvete fermentado e de *L. acidophilus*, *L. casei* e *L. rhamnosus* em iogurte (CAPELA; HAY; SHAH, 2006). Cardarelli et al. (2008) mostrou que o uso de inulina associado ao probiótico *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* em mousse de chocolate conferiu um potencial simbiótico ao produto.

Os alimentos funcionais constituem hoje a prioridade de pesquisa na área de nutrição e tecnologia de alimentos, levando-se em conta o interesse do consumidor por alimentos mais

saudáveis. O setor lácteo não foge a esta tendência de produzir alimentos em que a funcionalidade é um fator importante (SANTOS; GOULART; RAMOS, 2012).

O termo alimento funcional foi definido inicialmente no Japão, durante a década de 1980, como “alimento para uso específico de saúde”. O conceito contemporâneo refere-se aos alimentos ou nutrientes cuja ingestão leva a importantes mudanças fisiológicas no organismo, isoladas ou distintas daquelas associadas ao seu papel de nutriente (FDA, 2004). Neste segmento destacam-se alimentos com microrganismos probióticos, especialmente os produtos lácteos probióticos, que detêm imensa popularidade e representam a maior parcela do mercado mundial de alimentos funcionais (AGRAWAL, 2005; SIRÓ et al., 2008).

Tendo em vista um cenário promissor para os produtos simbióticos, estudos recentes têm sido desenvolvidos a fim de formular e desenvolver alimentos saborosos que tragam benefícios à saúde do consumidor. Segundo Coman et al. (2012), alimentos como queijos temperados, salame, chocolate, sorvete, geleia e mousse de chocolate foram excelentes veículos simbióticos, pois conseguiram manter a viabilidade das células probióticas ao redor de  $10^7$  a  $10^9$  UFC·g<sup>-1</sup>, até mesmo depois da data de expiração dos produtos.

### 2.2.1 Prebióticos

São substâncias não digeríveis, resistentes à hidrólise no estômago e no intestino delgado e, portanto, integram a categoria das fibras dietéticas, desempenhando funções importantes a nível nutricional, fisiológico e imunológico (GIBSON; ROBERFROID, 2008).

Estas fibras afetam positivamente os hospedeiros ao estimularem seletivamente a proliferação de bactérias benéficas no cólon. Esses microrganismos promovem a fermentação intestinal dos prebióticos produzindo metabólitos como ácido acético, butírico e propiônico, além de atuarem nos enterócitos reduzindo a inflamação, o risco carcinogênico, otimizando a absorção do cálcio, o metabolismo lipídico, aliviando constipações e diminuindo o colesterol sérico (GIBSON; ROBERFROID, 1995; SAAD, 2006).

Para um alimento ser classificado como prebiótico é necessário possuir as seguintes características (FOOKS; FULLER; GIBSON, 1999):

- Não sofrer hidrólise e nem ser absorvido na parte superior do trato gastrointestinal;
- Ser um substrato seletivo para um número limitado de bactérias potencialmente benéficas, estimulando seu crescimento e desenvolvimento de suas atividades metabólicas;

- Ser capaz de promover uma biota intestinal saudável, e como consequência, induzir efeitos benéficos ao hospedeiro.

A oligofrutose, os xilooligosacarídeos, a inulina, a lactulose, o amido resistente e outras fibras insolúveis são consideradas substâncias prebióticas (SIRÓ et al., 2008).

#### 2.2.1.1 Inulina

A inulina é uma fibra solúvel, considerada um ingrediente prebiótico. Comumente extraída da raiz da chicória, oferece uma gama de benefícios nutricionais e tecnológicos. Pode beneficiar o sistema digestivo, pois a ingestão de ingredientes prebióticos melhora o equilíbrio da nossa microflora intestinal, aumentando significativamente a quantidade de bactérias benéficas, inibindo os patógenos. O resultado disso é que o sistema digestivo trabalha melhor e aumenta a absorção dos nutrientes (MONTAN, 2003; MULLER, 2001; NEVEN, 2001; NITSCHKE; UMBELINO, 2002).

Ao contrário da maioria dos carboidratos, a inulina não é digerida no estômago. Quando ingerida, ela passa pelo intestino delgado, chega ao intestino grosso quase que integralmente, não sendo hidrolisada em unidades de monossacarídeos. Como consequência, sua contribuição calórica é pequena, cerca de  $1,5 \text{ Kcal}\cdot\text{g}^{-1}$ , contra  $4 \text{ Kcal}\cdot\text{g}^{-1}$  da sacarose, não levando ao aumento da glicemia, sendo então recomendada para diabéticos (ZULETA; SAMBUCETTI, 2001).

Trabalhos *in vivo* com aves apontam que a utilização de inulina em frangos de corte proporcionou um aumento na colonização de bactérias benéficas no intestino grosso das aves, atuando como substrato no desenvolvimento principalmente de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, microrganismos que favorecem melhor aproveitamento e absorção dos nutrientes da dieta (SILVA et al., 2011). Outras pesquisas *in vitro* e *in vivo* comprovam que há relação entre a ingestão de inulina e o aumento de bactérias probióticas, uma vez que essa fibra estimula a multiplicação de tais bactérias.

Mesmo em altas concentrações, a inulina é solúvel em água e não deixa na boca impressão de arenosidade. Apresenta boa dispersão nos líquidos, sendo pouco estável a pH inferior a 4 e a temperaturas maiores que  $180^{\circ}\text{C}$ . Devido às cadeias mais longas, a inulina é menos solúvel que as oligofrutoses e possui capacidade de formar microcristais quando misturada com água e leite. Estes microcristais interagem e formam uma mistura cremosa e macia, promovendo a mesma sensação de paladar que a gordura fornece (BONDT, 2003; MONTAN, 2003; NEVEN, 2001; NITSCHKE; UMBELINO, 2002). Também melhora a

textura, motivo pelo qual tem sido utilizada com sucesso como substituto da gordura, sem grandes modificações no processo de fabricação. Já é descrito o uso de inulina substituindo gorduras em recheios prontos, sobremesas congeladas e molhos (GOMES et al., 2007).

A inulina é um ingrediente higroscópico que dificulta a eliminação da umidade e favorece a sua absorção. Devido a essa propriedade, as formulações que contêm inulina apresentaram valores de umidade superiores às formulações que não a contêm (SANTOS; GOULART; RAMOS, 2012). Apresentou-se como ingrediente adequado para formulação de bolo de chocolate (VISSOTO; GOMES, 2005) e iogurte (BONDT, 2003; MONTAN, 2003; NITSCHKE; UMBELINO, 2002), uma vez que as formulações contendo o prebiótico demonstraram de maneira geral, propriedades químicas, físicas, preferência e estabilidade de armazenamento similares às formulações padrão desses alimentos.

É descrito que a inulina contribui para o aumento do sabor doce dos alimentos, e por possuir menor valor energético pode ser usada como substituto parcial do açúcar (FRANCK, 2008; VASCONCELOS, 2010). Além dos fatores tecnológicos, estudos demonstram que a adição de inulina em mousses aumenta a viabilidade dos probióticos (BURITI; CASTRO E SAAD, 2010).

Santos, Goulart e Ramos, (2012) avaliaram três formulações de doce de leite, uma sem adição de inulina e outras duas com adição de 3% e 3,5% de inulina. As amostras sem inulina e com adição de 3,0% apresentaram padrões físico-químicos dentro do exigido pela legislação. O atributo sabor foi avaliado por meio de teste sensorial e os resultados mostraram que não houve diferença significativa na aceitação do doce de leite cremoso tradicional e os doces com adição de inulina. Aragon-Alegro et al., (2007) também não relataram diferenças na preferência dos consumidores entre mousses de chocolates adicionados ou não de inulina. Já, Vasconcelos (2010) obteve uma aceitação superior no mix de açaí com adição da inulina.

A adição de inulina como ingrediente prebiótico mostrou-se uma alternativa interessante para utilização na formulação de doce de leite, mantendo seus aspectos de aceitabilidade (SANTOS; GOULART; RAMOS, 2012).

### 2.2.2 Probióticos

O termo probiótico já é bem conhecido e usado desde a década de 50. Na época, Vergin (1954) sugeriu que o equilíbrio da flora intestinal poderia ser perdido após o uso de antibióticos, e poderia ser restaurado por uma dieta de probióticos, incluindo alimentos fermentados. Com o passar dos anos, houve algumas modificações nesse conceito e hoje em

dia os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios a saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002).

Os probióticos considerados mais importantes são as bactérias ácido lácticas, as quais desempenham efeito benéfico conhecido no trato gastrointestinal. *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* e *Bifidobacterium* spp. são representantes dessa classe. Esses microrganismos são gram- positivos e geralmente anaeróbicos facultativos, com exceção do gênero *Bifidobacterium* que é anaeróbico estrito. Outros microrganismos como bactérias não ácido lácticas, e até algumas leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii* podem ser probióticas (ANAL; SINGH, 2007).

No Brasil, os probióticos atualmente regulamentados por legislação para aplicação em alimentos com alegação de propriedades funcionais são os descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Microrganismos probióticos regulamentados pela ANVISA para aplicação em alimentos.

Probióticos
<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus casei</i> var. <i>shirota</i>
<i>Lactobacillus casei</i> var. <i>rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus casei</i> var. <i>defensis</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>Bifidobacterium animalis</i> (incluindo a subsp. <i>B. lactis</i> )
<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>

Fonte: Brasil (2008).

Muitos estudos clínicos têm demonstrado a eficácia terapêutica e profilática de probióticos específicos contra gastroenterite viral aguda, diarreia associada a antibióticos, infecção por *Clostridium difficile* e por *Helicobacter pylori*, doença intestinal inflamatória e síndrome do intestino irritado (GILL, 2003). Os efeitos dos probióticos são cepa-dependentes, desse modo, cada cepa traz diferentes benefícios para a saúde, como melhora no metabolismo, na inflamação intestinal crônica, em distúrbios funcionais, em infecções e alergias (CHEN; CHEN, 2007). O mecanismo preciso pelo qual os probióticos potencializam a defesa gastrointestinal do hospedeiro e conferem proteção ainda não é completamente conhecido. Acredita-se que é em virtude da produção de nutrientes e co-fatores, competição com

patógenos pelos sítios de ligação e estimulação da resposta imune (SAIER; MANSOUR, 2005).

Segundo Dunne et al. (2001) os principais critérios para um microrganismo ser considerado probiótico são:

- Apresentar resistência à acidez gástrica e aos sais biliares. O baixo pH gástrico é um dos primeiros mecanismos de defesa contra a ingestão de microrganismos, incluindo probióticos;
- Devem aderir nas células da mucosa intestinal para aumentar a persistência e multiplicação dos microrganismos no intestino promovendo exclusão competitiva de patógenos potenciais da superfície intestinal;
- Devem produzir substâncias antimicrobianas contra patógenos intestinais a fim de restaurar a composição da microflora;
- Devem ser seguros em alimentos e durante o uso clínico, mesmo em indivíduos imunocomprometidos;
- Ter capacidade de ser produzido em grande escala e de forma viável. Também é importante que permaneça viável e ativo no produto que servirá de veículo;
- Deve ter sua segurança aprovada para o consumo humano, através de meios científicos e experiências baseadas no consumo de alimentos por um grande número de consumidores;
- Preferencialmente serem isolados do trato gastrintestinal humano, pois acredita-se que são mais seguros e mais efetivos na flora intestinal humana.

Um alimento vendido com alegações de trazer benefícios à saúde devido à adição de probióticos deve conter um número de células viáveis de, pelo menos,  $10^6$  a  $10^7$  UFC·g<sup>-1</sup> (FAO/WHO, 2002). A dose de ingestão de probióticos deve ser diária e depende da cepa, mas geralmente são aceitas ingestões de  $10^8$  a  $10^{10}$  UFC·dia (BRASIL, 2008; KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003; REID, 2008).

A viabilidade do probiótico na matriz alimentar depende de fatores como pH, temperatura de armazenamento, nível de oxigênio e presença de microrganismos inibidores. É importante que a formulação do produto seja capaz de manter a viabilidade do probiótico por período de tempo prolongado (SHAH, 2007). Além disso, o efeito dos probióticos está diretamente atrelado com a sua atividade no trato digestivo e para que haja ação benéfica efetiva essas culturas devem ser capazes de sobreviver ao baixo pH estomacal, às enzimas digestivas e sais biliares (BURITI et al., 2005). Alguns estudos já estão sendo feitos no



sentido de determinar a capacidade dos probióticos em prolongar a vida de prateleira desses novos alimentos funcionais (COMAN et al., 2012).

O uso de probióticos na alimentação é mais comumente evidenciado em produtos lácteos como kefir, leites fermentados e iogurte. Esses alimentos possuem características favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos e já possuem em sua flora normal bactérias ácido lácticas probióticas (ALMEIDA et al., 2008; ALMEIDA et al., 2009; ZOELLNER et al., 2009). No entanto, em alguns derivados lácteos como leites desidratados, ao sofrerem os processos tecnológicos de cocção e desidratação, essa flora benéfica é destruída pelo calor (JAY, 2005).

O interesse pela adição de microrganismos probióticos em diferentes alimentos vêm crescendo, como forma de aumentar seu valor nutricional e terapêutico (O'SULLIVAN, 2006; SIMEONI et al., 2014). Porém a principal dificuldade encontrada pelas indústrias na adição de bactérias probióticas em alimentos funcionais está relacionada à manutenção e viabilidade destas culturas.

#### 2.2.2.1 *Enterococcus faecium*

São cocos gram-positivos, catalase negativa, anaeróbico facultativo, capazes de fermentar glicose e crescer a 10°C e 45°C em meio contendo 6,5% de NaCl e pH de 9,6 (HOSSEINI et al., 2009; JAY, 2005). É um microrganismo encontrado em diferentes habitats, como solo, água, plantas e no trato gastrointestinal de homens e animais. Devido a essa correlação com o trato gastrointestinal, esse gênero é frequentemente encontrado em produtos de origem animal como carne *in natura*, cozida ou fermentada e também em leite e derivados (FRANZ; HOLZAPFEL; STILES, 1999). Até meados dos anos 80 foram descritos como *Streptococcus*, posteriormente foram reclassificados como *Lactococcus* e *Enterococcus*. (DEVRIESE; POT; COLLINS, 1993).

*Enterococcus* é considerado o terceiro maior gênero de bactérias ácido lácticas, atrás somente dos gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*. Atualmente 37 espécies de *Enterococcus* são descritas, as quais se dividem em sete grupos com base na semelhança do gene 16S rRNA (FRANZ; HOLZAPFEL, 2006).

Cepas de *E. faecium* possuem marcável perfil probiótico sendo capazes de sobreviver a pH 3,0, aos sais biliares, pancreatina e pepsina. Foram detectadas na matéria fecal em taxas de 10<sup>4</sup> a 10<sup>5</sup> UFC·g<sup>-1</sup> (FRANZ et al., 2011).

A resistência natural dessa bactéria em relação ao pH e concentração salina, propiciam a ocorrência de altas contagens de *Enterococcus* nos alimentos fermentados. Suas propriedades tecnológicas benéficas na maturação e produção de aroma em queijos e carnes torna essa bactéria uma alternativa interessante para o uso como culturas starters (FRANZ et al., 2011). Há estudos que mostram que a adição de *E. faecium* como probiótico inibiu o crescimento de bactérias patogênicas e deterioradoras presentes nos alimentos (HOSSEINI et al., 2009; PÉREZ-CHABELA et al., 2009).

De acordo com Ramírez-Chavarín et al. (2010), *E. faecium* pode ser isolado normalmente de produtos submetidos a altas temperaturas, suportando até 70 °C por 30 min. Sabe-se que esse microrganismo é uma das espécies não esporuladas mais resistentes às condições adversas.

Essas bactérias, quando ingeridas em grandes quantidades conferem efeitos funcionais e benéficos à saúde, especialmente para o tratamento de doenças como síndrome do intestino irritado, diarreia infecciosa, diarreia associada ao uso de antibióticos, redução dos níveis de colesterol e regulação da resposta imune. Esses efeitos benéficos se dão através da interação do *E. faecium* com a flora microbiana intestinal, reduzindo agentes patogênicos por exclusão competitiva (HOSSEINI et al., 2009).

Os produtos lácteos são os mais comumente utilizados como veículos de bactérias probióticas, com apelo de alimento funcional. No entanto vários fatores que afetam a viabilidade dos probióticos têm sido relatados nesses produtos, incluindo a acidez titulável, o valor de pH, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura de armazenamento, a interação com outros microrganismos contidos nos produtos, a concentração de ácido láctico e acético, além da concentração de proteínas, açúcares e a atividade de água (CASTRO-CISLAGHI; FRITZEN-FREIRE; SANT'ANNA, 2012).

Para que um alimento possa carrear as células probióticas com segurança e viabilidade, assegurando a eficácia do produto funcional, vários fatores devem ser levados em consideração, como a seleção adequada da cultura probiótica, a concentração do inóculo, o estágio do processamento em que a cultura é adicionada, atributos físico-químicos e ingredientes do produto (COMAN et al., 2012).

Já é demonstrada a viabilidade de *E. faecium* por seis meses a -20°C quando microencapsulada com alginato e quitosana. Além disso, as células microencapsuladas resistiram ao pH estomacal e intestinal em testes *in vitro*, aumentando a colonização intestinal quando comparada a células não encapsuladas (KANMANI et al., 2011). Cepas de *E. faecium*

protegidas por microencapsulação tiveram sobrevivência significativamente maior quando comparado com células sem proteção (PÉREZ-CHABELA et al., 2009).

### **2.3 Microencapsulação**

A viabilidade dos probióticos é de suma importância, uma vez que eles devem chegar e permanecer vivos no sítio de ação, para que possam desempenhar o seu papel na saúde dos consumidores (CHAMPAGNE et al., 2011). No entanto, trabalhos relatam que a sobrevivência de células probióticas, livres nos alimentos, é baixa (DE VOS et al., 2010). Tornando-se necessária a existência de uma barreira física, resistente às condições adversas do meio (KAILASAPATHY, 2009).

Desai e Park, (2005) definem microencapsulação como o empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas que liberam seu conteúdo de forma controlada e sob condições determinadas. Em suma, a microencapsulação surgiu como uma alternativa para aumentar a viabilidade das bactérias probióticas, tanto nos alimentos quanto durante a passagem pelo trato gastrointestinal, assim como controlar a liberação no aparelho digestivo (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007).

Conhecendo-se as características intrínsecas do doce de leite, de baixa atividade de água ( $A_w \pm 0.85$ ) e alta concentração de sólidos totais (cerca de 70%), as quais tornam o alimento um meio inóspito para o desenvolvimento e manutenção de bactérias probióticas (CHAR et al., 2005), faz com que seja necessário uma alternativa para manter as células viáveis no produto. Provavelmente por esse motivo, não foram encontrados na literatura trabalhos que utilizaram o doce de leite como veículo de probióticos.

A administração oral dessas bactérias é outro fator que resulta em uma perda significativa da viabilidade devido à passagem pelo trato gastrointestinal, principalmente pela alta acidez estomacal e concentração de sais biliares. Essa perda de viabilidade diminui a eficácia dos produtos funcionais (COOK et al., 2012). O microrganismo que se mostrar metabolicamente estável no produto e sobreviver à passagem pelo trato digestivo com boa viabilidade, poderá apresentar efeitos benéficos quando colonizar o intestino do hospedeiro (ANAL; SINGH, 2007).

A microencapsulação está sendo pesquisada como forma de isolar o probiótico do ambiente adverso, conferir resistência aos microrganismos durante o processo de produção e aumentar a viabilidade das células probióticas durante a estocagem dos produtos (MARTIN et al., 2013). Essa tecnologia consiste em um processo mecânico ou físico-químico que

imobiliza e protege os microrganismos em uma matriz, que é capaz de manter sua estrutura no estômago, sendo dissolvida somente no intestino. O material usado para a formação da cápsula é denominado substância encapsulante ou cobertura, enquanto que o material encapsulado chama-se recheio ou núcleo. As partículas geradas são classificadas de acordo com o seu tamanho. As macrocápsulas possuem diâmetro acima de 5.000  $\mu\text{m}$ , as microcápsulas medem entre 0.2 a 5.000  $\mu\text{m}$  e as nanocápsulas são menores que 0.2  $\mu\text{m}$  (BORGOGNA et al., 2010; GIBBS, 1999).

Diferentes procedimentos podem ser usados na encapsulação de probióticos e cada um deles fornece microcápsulas com diferentes características. O tipo e a concentração do material de revestimento, o tamanho das partículas, o número de células bacterianas iniciais e a cepa bacteriana são alguns parâmetros relevantes no processo de microencapsulação (CHEN; CHEN, 2007).

Os métodos de microencapsulação mais utilizados são atomização, *spray drying*, emulsificação e extrusão, dentre outros (BURGAIN et al., 2011; COOK et al., 2012). No entanto, nem todas essas técnicas são apropriadas para encapsulação de probióticos, devido à termossensibilidade das bactérias e o tamanho considerável das partículas formadas. É importante atentar para esse fator, que pode variar de acordo com o processo de obtenção das partículas, da técnica de encapsulação, do material encapsulante e do recheio. Basicamente, a adição dessas partículas no alimento não deve prejudicar as características físicas e sensoriais do produto, como a textura, a estabilidade e o sabor (CHEN, 2007).

Nos últimos anos diversos métodos e materiais têm sido investigados para produção de micropartículas, tal como, a gelificação iônica utilizando polissacarídeos naturais como o alginato (PATIL et al., 2010). A gelificação iônica é uma técnica de microencapsulação simples, rápida, de fácil execução e de baixo custo (BAJPAI; TANKHIWALE, 2006) que ocorre quando uma solução polimérica é gotejada em uma solução iônica, geralmente cloreto de cálcio, que em concentrações adequadas irá formar instantaneamente micropartículas tridimensionais de diferentes formas e tamanhos, que englobam o núcleo encapsulado (VOS et al., 2009).

O processo de microencapsulação por gelificação iônica ocorre de duas maneiras distintas: gelificação iônica externa e interna. Quando o cálcio é fornecido no interior das cápsulas teremos a gelificação iônica interna, de dentro para fora. Já, se a fonte de cálcio é externa, ocorre a gelificação iônica externa, que se inicia na interfase, de fora para dentro da matriz, e a medida que a superfície se encontra saturada de íons cálcio, a gelificação alcança o centro da partícula (HELGERUD et al., 2010).

A técnica mais utilizada para obtenção de microcápsulas de alginato por gelificação iônica é a extrusão, por sua uniformidade de conformação e tamanho das partículas (PASIN; AZÓN; GARRIGA, 2012). A técnica consiste na geração de microgotas da solução de alginato, contendo o núcleo a ser encapsulado, que se formam ao passar por um dispositivo extrusor, com tamanho e velocidade de gotejo controlado (Figura 1). Essas microgotas caem sobre um banho que contém a fonte de íon divalente, ocorrendo a formação do hidrogel, por gelificação iônica externa (CHAN et al., 2010).

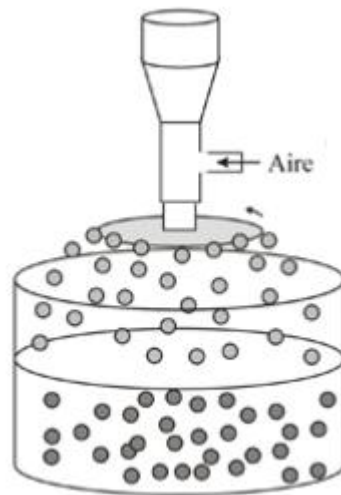


Figura 1 – Microencapsulação por gelificação iônica através da técnica de extrusão.

Fonte: Zuidam e Shimoni (2010).

As microcápsulas formadas pela técnica de extrusão possuem o núcleo totalmente disperso na matriz encapsulante, podendo apresentar uma parte do material encapsulado na superfície da matriz. A forma de liberação do recheio pode ser parcial ou total e diferentes mecanismos podem ativar essa liberação, como pH, ação enzimática, osmolaridade, temperatura, ruptura mecânica, dentre outros (MAESTRELLI et al., 2008).

As partículas formadas apresentam textura suave, com características de biocompatibilidade com membranas, em consequência da natureza hidrofílica do material e seu conteúdo de água ao redor de 95% (DE VOS et al., 2006).

A principal limitação desta técnica é o tamanho considerável das cápsulas formadas, que irá depender do diâmetro do bico atomizador do equipamento de extrusão, da pressão do ar comprimido, da distância entre o bico atomizador e a solução iônica e do tempo necessário para que ocorra uma completa gelificação (MOFIDI; AGHAI-MOGHADAM; SARBOLOUKI, 2000). Pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de melhorar essa

técnica e demonstraram que ao usar equipamentos extrusores com bicos múltiplos, discos aspersores e fluxo de ar comprimido conseguiu-se redução no tamanho da partícula, sendo possível a formação de microcápsulas (CHAMPAGNE et al., 2000; MARK et al., 2009).

A importância da escolha correta do material encapsulante e de como a matriz encapsulante influencia na sobrevivência do probiótico no estômago é discutida por Klayraung, Viernstein, Okonogi, (2009). A seleção do material e do método é dependente da aplicação que será dada à microcápsula, do método de microencapsulação, do tamanho desejado das partículas, do mecanismo de liberação, propriedades biológicas e físico-químicas, tanto da cultura quanto do agente encapsulante (ANAL; SINGH, 2007; FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

Os materiais de cápsulas mais utilizados são alginato de cálcio, pectina, goma xantana, carragena, acetato ftalato de celulose, quitosana, amido e amido resistente, gelatina e proteínas do leite (COOK et al., 2012).

### 2.3.1 Alginato

O ácido algínico é um composto que se encontra na parede celular de algas marinhas pardas, do grupo das feofíceas. Os alginatos são sais do ácido algínico que podem ser formados com sódio, potássio, magnésio, cálcio, entre outros. Possuem diferentes graus de solubilidade em água, o que confere a viscosidade da solução (YABUR; HERNÁNDEZ, 2007).

O alginato é classificado quimicamente com um heteropolissacarídeo linear aniônico formado por dois monômeros: o ácido D - manurônico (M) e o ácido L - gulurônico (G), como mostra a Figura 2. Esses monômeros se distribuírem em partes, constituindo homopolímeros de blocos G ou M e heteropolímeros, com ambos blocos M e G (PASIN; AZÓN; GARRIGA, 2012; SOUZA JUNIOR, 2006).

A distribuição dos monômeros na cadeia polimérica e a carga conferem ao gel as características de flexibilidade ou rigidez. Se na sua estrutura há maior quantidade de blocos G, geralmente o gel é rígido e frágil, enquanto que com a presença majoritária de blocos M o gel é macio e elástico (PASIN; AZÓN; GARRIGA, 2012).

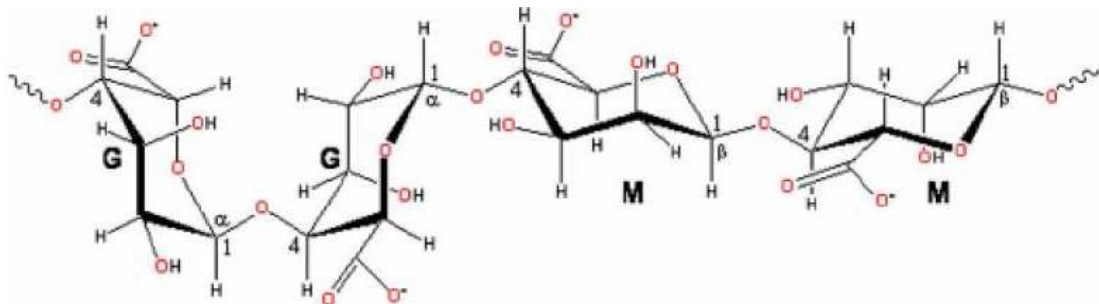


Figura 2 – Estrutura química do alginato com grupos de ácido L - gulurônico (G) e grupos de ácido D - manurônico (M).

Fonte: Souza Junior (2006).

Ao dissolverem-se em água, as moléculas do alginato se hidratam e aumentam a viscosidade. Em solução ácida os grupos carboxílicos dos ácidos urônicos recebem prótons e reforçam a ligação dos blocos G, formando géis de alta viscosidade e baixa solubilidade, em pH de 3,0 a 4,0 (LUPO; GONZÁLES; MAESTRO, 2012).

No processo de gelificação iônica ocorre a união entre duas moléculas distintas de alginato pelo enlaçamento dos monômeros G, que se dá através dos íons de cálcio. Como consequência desta união de moléculas, acontece um reordenamento estrutural resultando em um material sólido, com características de gel e estrutura química semelhante a uma caixa de ovos, assim definida por Draget (2007) (Figura 3). O grau de gelificação depende da hidratação do alginato, a concentração do íon cálcio e a quantidade de monômeros G.

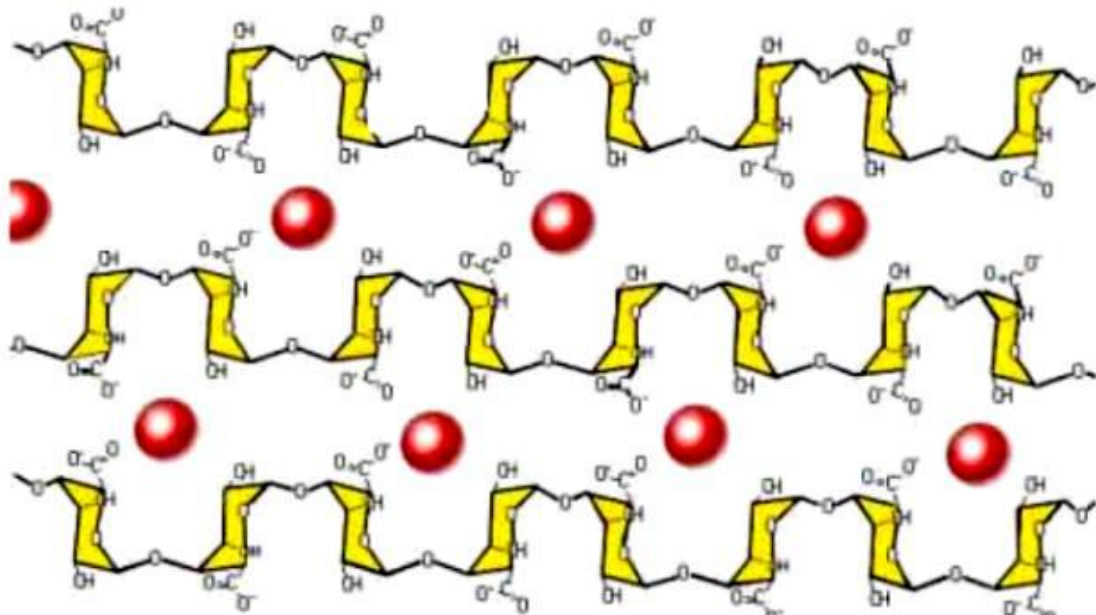


Figura 3 – Estrutura tridimensional do hidrogel de alginato, com interações entre íons Ca<sup>2+</sup> e os grupos carboxílicos do alginato.

Fonte: Santos (2014).

Tanto o ácido algínico como seus sais de sódio, potássio, cálcio e amônio são considerados inócuos e seguros para utilização em alimentos, segundo a *Food And Drug Administration* (FDA). Estão listados também no *Codex Alimentarius* (FAO) e na *World Health Organization* (WHO), onde estão descritos os limites de ingesta diária do ácido algínico e seus sais para humanos, que é fixado em 50 mg·Kg de peso corporal (FAO/WHO, 2001)

O alginato ao ser adicionado a um alimento prolonga a sua vida útil, reduz as alterações desenvolvidas durante seu armazenamento e atua como estabilizante, espessante, gelificante e formador de película. Estudos mostram que, além de tudo, o alginato é também considerado uma fonte prebiótica e sua ingesta como fibra alimentar pode trazer benefícios como a redução dos níveis de colesterol e açúcares no sangue. Por esses motivos, o alginato é um ingrediente muito utilizado em sobremesas, produtos de confeitaria, sorvetes, condimentos e embutidos (IMESON, 2010; ROMERO; MALO; PALOU, 2013).

Devido a essas propriedades mencionadas acima e a sua capacidade de proteger as células probióticas do estresse térmico, pH e oxigênio, além de ser atóxico, ter custo acessível, formar facilmente matriz ao redor das células bacterianas e ser aditivo aceito para alimentos (PREVOST; DIVIES, 1992; SHEU; MARSHAL, 1993), o alginato tem sido frequentemente utilizado para proteção de bactérias ácido-láticas (MARTIN et al., 2013).

Por apresentarem grupos hidrofílicos, os alginatos possuem alta solubilidade, boa capacidade de absorver água, alteram facilmente sua viscosidade, são de fácil manipulação e constituem um material inócuo (FUNAMI, 2009; PASIN; AZON; GARRIGA, 2012). A capacidade de absorver água está atrelada a porosidade da matriz, quanto maior o número de poros, maior a afinidade pela água (MOURA; RUBIRA; MUNIZ, 2008).

A resistência à compressão, ou seja, a rigidez das cápsulas de alginato é proporcional à concentração utilizada, assim sendo, quanto mais concentrado o hidrogel, mais rígido ele será (MOURA; RUBIRA; MUNIZ, 2008). Além disso, o alginato forma gel a qualquer temperatura e com propriedades termotolerantes, o que confere estabilidade à cápsula para ser adicionada a alimentos termicamente processados (GARCIA CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008).

Estudos indicam que o alginato de sódio de baixa viscosidade pode permanecer armazenado de 10 a 20 °C por três anos, sem alterações. Alginato de sódio de média viscosidade mostra perda de 10% a 25 °C e de 45% a 33 °C após um ano e os alginatos de alta viscosidade são menos instáveis (Mc DOWELL, 1997).



No entanto, a desvantagem desse polissacarídeo é a alta porosidade da superfície da matriz, tornando-a sensível às condições ácidas do meio (MORTAZAVIAN et al., 2007; MOURA; RUBIRA; MUNIZ, 2008). Segundo Moura, Rubira e Muniz (2008), o aquecimento desses hidrogéis de alginato não interferem na porosidade, pois não há contração significativa da matriz. Para suprir esse problema, é possível recobrir as cápsulas com outros compostos poliméricos, a fim de garantir um maior efeito protetor aos microrganismos (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003). A resistência mecânica e a permeabilidade destas partículas podem ser melhoradas com a formação de uma ou mais camadas de polieletrólitos de cargas opostas sobre sua superfície (ANAL; STEVENS, 2005; PATIL et al., 2010; YEO; BAEK; PARK, 2001).

Diversas pesquisas mostraram melhoras nas propriedades físico-químicas do alginato ao combinarem matrizes mistas com quitosana, proteína do ovo e proteína do soro do leite (CHÁVARRI et al., 2010; CHEN; SUBIRADE, 2006). Uma variedade de polímeros naturais e sintéticos tem sido investigada para a formação de multicamadas, e dentre esses, os polímeros naturais, as proteínas do soro do leite têm se destacado principalmente pelas suas propriedades plastificantes, essenciais para formação de filmes fortes e flexíveis (FLORIS et al., 2008) e por formar complexos eletrostáticos com o alginato para concepção de sistemas com estabilidade e resistência desejáveis para aplicações entéricas (GBASSI et al., 2009; PATIL et al., 2010).

A interação eletrostática ocorre entre biopolímeros carregados com cargas opostas, que interagem entre si (PHILIPP et al., 1889). Na maioria dos casos, os sistemas de biopolímeros utilizados incluem uma molécula proteica como polieletrólito positivo e uma molécula de polissacarídeo como polieletrólito negativo (JUN-XIA; HAI-YAN; JIAN, 2011).

As proteínas apresentam carga líquida negativa acima do seu ponto isoelétrico (pI é quando o composto apresenta carga elétrica nula) e carga líquida positiva abaixo do pI, enquanto que os polissacarídeos aniônicos tem carga negativa máxima em valores de pH bem acima do seu pKa, mas perdem progressivamente essa carga a medida que o pH é reduzido (JONES; DECKER; McCLEMENTS, 2010). O pKa do alginato é ao redor de 3,4, podendo variar de 3,38 a 3,65, dependendo da composição das unidades de ácido manurônico e gulurônico (HAUG, 1961; MARFIL, 2014), apresentando-se carregado negativamente acima do pH correspondente ao seu pKa (pH 3,65 - 3,80) (SIMSEK- EGE; BOND; STRINGER, 2003). Essa carga líquida negativa é proveniente dos grupamentos carboxilas carregado negativamente (COO-) ao longo dos blocos D-manurônico e L-gulurônico (BAJPAI;

TANKHIWALE, 2006), para soluções com pH acima de seu pKa, sendo que a medida que este pH aumenta, maior é sua carga negativa (JONES et al., 2010).

Sabe-se que o pH exerce uma grande influência na intensidade da interação eletrostática, pois este determina o grau de ionização dos grupos laterais (grupos amina e carboxílico) dos biopolímeros afetando sua carga total (SCHMITT et al., 1998; SCHMITT et al., 1999). À medida que o pH é reduzido abaixo do pI da proteína, tende-se a formar complexos insolúveis ou coacervados, devida à forte interação entre as cargas opostas da proteína e do polissacarídeo (JONES; DECKER; McCLEMENTS, 2010).

A formação e as propriedades das microcápsulas com revestimento são influenciadas pela concentração e pH das soluções de polieletrólitos, números e espessura das camadas desejadas, força iônica, temperatura e tempo de deposição (HALTHUR; CLAEISSON; ELOFSSON, 2004; LANKALAPALLI; KOLAPALLI, 2009; RICHERT et al., 2004; SRIVASTAVA; KOTOV, 2008; SUKHORUKOV et al., 2001).

Segundo Nogueira (2013) as condições ideais para que ocorra maior adsorção proteica de WPC na microcápsula de alginato é com pH abaixo de 4,5, pois nessa faixa o polissacarídeo e a proteína apresentam cargas opostas. O manuseio cuidadoso desses fatores permitem a projeção e a fabricação de partículas com multicamadas, de modo a atingir a estabilidade físico-química, atender as condições de proteção e liberação do material encapsulado, mediante estímulos específicos.

### 2.3.2 Concentrado proteico de soro do leite (WPC)

O soro de leite é o líquido residual obtido a partir da coagulação do leite destinado à fabricação de queijos ou de caseína (BRASIL, 2005). É um subproduto de relevante importância na indústria de laticínios, tendo em vista o volume produzido e sua composição. A proteína do soro do leite é disponibilizada no mercado interno geralmente sob a forma de pó, em suplementos alimentares, no entanto no Brasil sua industrialização é limitada (HUFFMAN, 1996).

De acordo com Fitzsimons, Mulvihill e Morris (2006), o soro de leite contém, em média, 93% de água, 5% de lactose, 0,9 a 0,7% de proteínas, 0,5 a 0,3% de gordura, 0,2% de ácido lático e pequenas quantidades de vitaminas. Possui bom valor nutricional, contém alto teor de aminoácidos essenciais, cálcio e de peptídeos bioativos. Pesquisas recentes demonstram seus possíveis efeitos sobre a síntese proteica muscular esquelética, redução da gordura corporal, assim como na modulação da adiposidade. Estudos envolvendo a análise de

seus compostos bioativos evidenciam benefícios para a saúde humana. Entre esses possíveis benefícios destacam-se seus efeitos antimicrobianos, hipotensivo, antioxidantes, imunomoduladores e hipocolesterolêmico (HARAGUCHI; ABREU DE PAULA, 2006).

No leite, as proteínas estão agrupadas em dois grupos: caseínas (2,7%) e proteínas do soro do leite (0,8%) (AIMUTIS, 2004). Cada classe apresenta uma propriedade funcional diferenciada. As proteínas do soro do leite apresentam uma estrutura globular contendo algumas pontes de dissulfeto, que conferem certo grau de estabilidade estrutural. Os peptídeos do soro são constituídos de: beta-lactoglobulina (BLG), alfa-lactoalbumina (ALA), soro albumina (BS), imunoglobulinas (Ig's) e glicomacropéptídeos (GMP). Essas frações podem variar em tamanho, peso molecular e função, fornecendo às proteínas do soro características especiais (AIMUTIS, 2004).

A BLG é o peptídeo encontrado em maior quantidade no soro (45,0% a 57,0%), que juntamente com a ALA perfazem cerca de 70 a 80% das proteínas totais do soro. O peso molecular da BLG está na faixa de 18,4 a 36,8 kDa, o que lhe confere resistência à ação de ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago, sendo, portanto, absorvida no intestino delgado (DE WIT, 1998).

Estudos demonstram que, ao serem utilizadas em alimentos, as proteínas do soro propiciam vantagens funcionais e tecnológicas como: aumento da viscosidade e retenção de água, capacidade de formar géis, emulsificam, retêm e incorporam gordura, realçam a cor o sabor e a textura, além dos vários benefícios nutricionais (USDEC, 1997).

No Brasil, as indústrias de doce de leite utilizam o soro do leite na fabricação do produto. A adição do soro é permitida por legislação, já que é um derivado lácteo. No entanto, seu uso deve ser informado para não caracterizar uma fraude econômica. Apesar do uso indiscriminado, pouco ou nada se sabe sobre os efeitos e alterações que causam nas características físico-químicas, rendimento e vida útil do doce de leite (FERREIRA, 2009).

As proteínas do soro do leite, na forma de concentrado proteico de soro de leite (WPC), isolado proteico de soro (IPS) ou ainda na forma de soro de leite líquido, têm sido usadas na microencapsulação de probióticos (DOHERTY et al., 2011; GBASSI et al., 2011; PICOT; LACROIX, 2004; REID et al., 2007; RODRÍGUEZ-HUEZO et al., 2007).

A composição química média do concentrado proteico do soro de leite é apresentada na Tabela 4.

Nogueira (2013) elaborou micropartículas de alginato com multicamadas de proteína do soro do leite, com alta adsorção proteica, capazes de serem estáveis em condições adversas do meio e parcialmente resistente às condições gastrointestinais.

Tabela 4 – Composição química do concentrado proteico do soro de leite (WPC).

Componente	WPC (%)
Proteínas	82,72
Lipídeos totais	6,24
Cinzas	3,04
Lactose	6,64
Umidade	1,36
Sólidos Totais	98,64

Fonte: Pacheco et al. (2005).

A maioria dos estudos que utilizaram sistemas mistos de alginato com proteína de soro de leite proporcionou maior proteção à célula microbiana frente à matriz pura (CHÁVARRI et al., 2010).

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Elaboração das microcápsulas probióticas

As microcápsulas probióticas foram desenvolvidas no Laboratório de Micropartículas do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria, RS.

A matriz encapsulante utilizada na elaboração das microcápsulas foi o alginato de sódio de baixa viscosidade (Vetec Química Fina<sup>®</sup>) na concentração de 2,0%, e o material de cobertura foi proteína do soro do leite (WPC 80% Alibra<sup>®</sup>), nas concentrações de 0,5 e 2,0%. As microcápsulas que não receberam a sobrecamada foram denominadas tratamento “T0%”, as microcápsulas que receberam sobrecamada de WPC de 0,5% foram denominadas tratamento “T0,5%” e as microcápsulas que receberam sobrecamada de 2% de WPC foram denominadas tratamento “T2%”. Ainda, nos testes em que foram utilizadas células probióticas livres, sem a microcápsula, denominou-se tratamento “C”.

O microrganismo probiótico microencapsulado foi *Enterococcus faecium* C080161 (Lyofast<sup>®</sup>). A ativação da cultura foi feita conforme descrito por Kanmani et al., (2011). Incubou-se 1 g da cepa liofilizada em 50 mL de caldo MRS (Man, Rogosa e Sharpe), a 37 °C por 12 h. Posteriormente, os 50 mL incubados foram transferidos para 2 litros de caldo MRS (HIMEDIA<sup>®</sup>) também incubado em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 h.

O caldo contendo a cultura foi centrifugado em centrífuga refrigerada HITAKI CR 22 GIII (himac<sup>®</sup>), em tubos de 500 mL por 15 min. a 10.000 RPM sob temperatura de 4 °C. O *pellet* foi ressuspenso em solução salina 0,85% (KANMANI et al., 2011). A biomassa de *E. faecium* foi homogeneizada no alginato de sódio de baixa viscosidade a 2,0% estéril. Para determinar a massa bacteriana presente na solução, realizou-se contagem bacteriana total através de diluições decimais seriadas em solução salina estéril 0,85% e plaqueamento em ágar MRS (KASVI<sup>®</sup>). As placas foram incubadas em jarra de anaerobiose, em estufa bacteriológica a 37 °C por 72 h.

Foram realizados testes preliminares com a finalidade de padronizar a metodologia e adequá-la ao padrão de microcápsula desejada. As concentrações de alginato e cloreto de cálcio foram ajustadas através de um diagrama de fases, para determinação da concentração ideal de cada solução para a formação do gel. A pressão do ar, vazão da solução encapsulante,

tamanho e altura do bico extrusor foram sendo testadas e modificadas até que se pode verificar na microscopia óptica cápsulas com formato e tamanho desejados.

A microencapsulação foi realizada através da técnica de extrusão/atomização (BOSCARIOLI, 2010; ECTHEPARE, 2014; LISERRE; RÉ; FRANCO, 2007) em microencapsulador de inox com bico atomizador de 3  $\mu\text{m}$ , acoplado em sistema de ar comprimido (Figura 4). A matriz de alginato com a cultura de probióticos foi bombeada ao microencapsulador com o auxílio de bomba peristáltica.

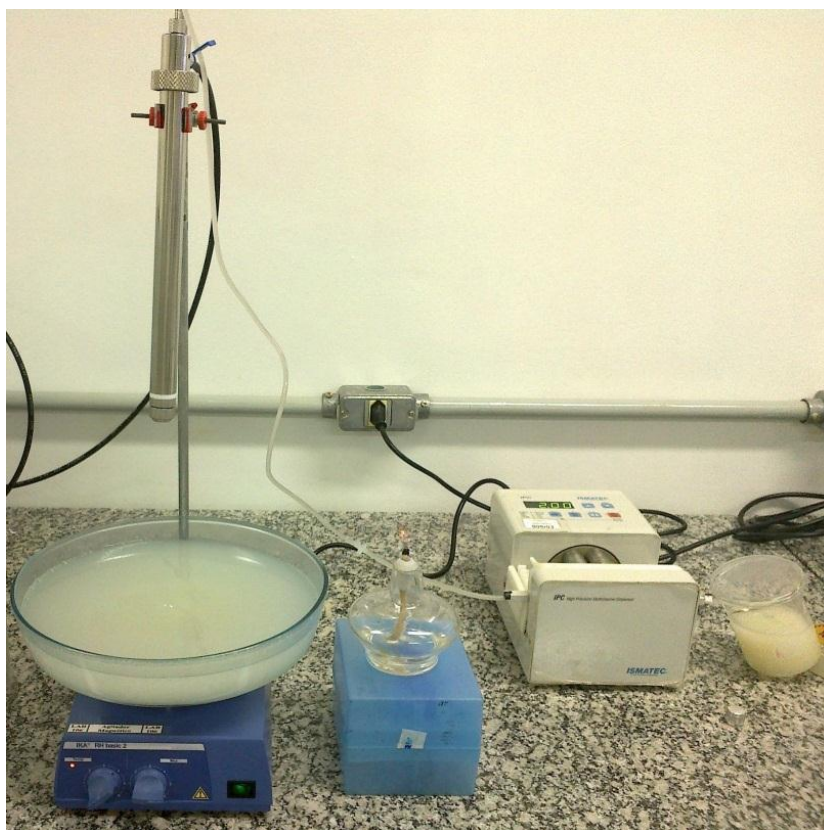


Figura 4 – Equipamento de extrusão/atomização utilizado para elaboração das microcápsulas probióticas.

Fonte: Autor (2015)

O bico do microencapsulador foi posicionado verticalmente, 15 cm acima da superfície do recipiente contendo uma solução de cloreto de cálcio dihidratado (Vetec Química Fina<sup>®</sup>) estéril a 0,1 molar (14,7 g/L de água) e pH de 4,0. As microcápsulas foram então aspergidas, com pressão de 20 psi e com velocidade de vazão de 2 mL/min., sobre a solução de cloreto de cálcio em agitação, por 30 min., até a completa gelificação iônica externa.

Decorrido o tempo de agitação, as microcápsulas foram filtradas em peneiras de aço inoxidável estéreis e lavadas com água destilada estéril pH 4,0. Posteriormente foram colocadas em uma solução de concentrado proteico de soro do leite (WPC) estéril com pH 4,0, nas concentrações de 0,5 e 2,0%. As soluções de WPC contendo as cápsulas ficaram em agitação por 30 min., para adsorção máxima das proteínas na matriz encapsulante. Em seguida as cápsulas foram filtradas novamente e lavadas com água destilada estéril pH 4,0 e acondicionadas em placas de Petri estéreis para análises posteriores (NOGUEIRA, 2013).

As micropartículas foram caracterizadas, em relação ao conteúdo total de proteína e umidade no Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais (Nidal), na UFSM. As análises foram realizadas de acordo com a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005). A umidade foi determinada por secagem em estufa a temperatura de 105 °C por 12 horas. Para a quantificação de proteína na partícula, foi realizada a metodologia de Kjeldahl, utilizando o fator de conversão de nitrogênio, todas as análises foram feitas em triplicata.

### 3.2 Eficiência da microencapsulação

Para verificação da eficiência da microencapsulação, ou seja, comprovar que o microrganismo probiótico foi revestido pela matriz encapsulante, foi feita a contagem bacteriana de microrganismos viáveis, segundo descrito por Sheu, Marshall e Heymann (1993). Para contagem de *E. faecium*, 1 g de microcápsula foi diluída em uma saqueta estéril com 9 mL de solução tampão fosfato pH 7,5 para liberação da matriz encapsulante. A homogeneização foi feita em Bag Mixer (Marconi<sup>®</sup>) a 200 RPM por 5 min. Posteriormente realizou-se a diluição decimal seriada, em tubos com solução salina estéril 0,85%. O plaqueamento das diluições foi feito em ágar MRS, incubado em jarra de anaerobiose em estufa bacteriológica por 72 h, para contagem das células bacterianas viáveis.

O rendimento da microencapsulação (RM) foi calculado através da fórmula:  $RM = (N/N_0) \times 100$ , em que  $N_0$  é o número de células viáveis na solução de alimentação do microencapsulador e  $N$  é o número de células viáveis nas cápsulas obtidas, ambos expressos em  $\text{Log UFC} \cdot \text{g}^{-1}$  (PICOT; LACROIX, 2004). O rendimento é uma medida combinada da eficiência da tecnologia de microencapsulação e da sobrevivência das células viáveis durante o processo (ANNAN; BORZA; TRUELSTRUP HANSEN, 2008).

### **3.3 Capacidade termotolerante das microcápsulas probióticas contendo *E. faecium***

A resistência do *E. faecium* a altas temperaturas foi avaliada tanto na célula livre quanto na microencapsulada. Uma quantidade de 1 g das microcápsulas e 1 mL da suspensão contendo as células livres foram adicionadas em tubos contendo 10 mL de água destilada. Os tubos foram submetidos a banho maria por 15, 20 e 30 min. a 70 °C, conforme proposto por Sabikhi et al. (2010). Para determinação das células viáveis, 1 g das microcápsulas foram homogeneizadas com 9 mL de solução tampão fosfato pH 7,5 e agitadas em Bag Mixer (Marconi<sup>®</sup>) por 5 min. a 200 RPM.

A contagem bacteriana foi realizada através de diluições decimais seriadas e plaqueamento em ágar MRS. As placas foram incubadas em jarra de anaerobiose, em estufa bacteriológica a 37 °C por 72 h.

### **3.4 Teste de resistência *in vitro* das microcápsulas probióticas contendo *E. faecium* às condições gastrointestinais**

A viabilidade das microcápsulas frente às condições gastrointestinais foi avaliada conforme descrito por Kanmani et al. (2011) com algumas adaptações. As microcápsulas probióticas (10 g) foram adicionadas em 90 mL de solução ácida pH 2,5 contendo pepsina suína (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), na concentração de 3 g/L. Posteriormente foram incubadas a 37 °C em *shaker* por 120 min., com agitação de 150 RPM. Na etapa subsequente o pH foi alterado para pH 7,5 e foram adicionadas bile bovina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) e pancreatina suína (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), na proporção adequada para uma concentração final de 3 g/L e 1 g/L respectivamente, por mais 120 min. Para a contagem de bactérias probióticas, foram retiradas alíquotas em intervalos pré-definidos de 30, 60 e 120 min., para pH 2,5, e 7,5.

### **3.5 Análise morfológica das microcápsulas probióticas contendo *E. faecium***

A análise morfológica das microcápsulas foi realizada no Laboratório de Micropartículas do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da UFSM, através de microscópio óptico da marca Zeiss, modelo Axio Scope. A1, com câmera digital Axio cam acoplada (Figura 5). As partículas úmidas foram analisadas com aumento de 100 a 400 vezes.

A morfologia das microcápsulas liofilizadas foi observada por microscopia eletrônica de varredura (M.E.V), em equipamento da marca JEOL<sup>®</sup>, modelo JM 6360, no Departamento



de Engenharia Mecânica da UFSM. As amostras foram previamente fixadas em *stubs* com fita metálica dupla face de cobre e recobertas com uma fina camada de ouro. O tamanho das micropartículas úmidas foi mensurado no equipamento Mastersizer 2000 (Malvern®) no Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQUIA) do Departamento de Química da UFSM. O equipamento determina o tamanho das partículas por difração de luz laser, sendo que o material utilizado como dispersante foi água destilada pH 4,0. Após a análise geral da forma, tamanho e superfície das microcápsulas, foram tiradas microfotografias para registro.



Figura 5 – Microscópio óptico com câmara digital acoplada para registro das microfotografias.

Fonte: Autor (2015)

### **3.6 Preparo do doce de leite *light* adicionado de *E. faecium* microencapsulados com sobrecamada de WPC**

O produto foi elaborado com leite UHT desnatado de marca comercial, açúcar tipo cristal de marca comercial, bicarbonato de sódio de marca comercial, sucralose (Linea®) e inulina (Frutafit® - Metachem) conforme demonstrado no Quadro 1. O processo de fabricação e a formulação foram elaboradas após realização de testes preliminares, por adaptação da tecnologia descrita por Martins e Lopes (1981), Santos, Goulart e Ramos (2012) e Guimarães et al (2012a).

Ingredientes	Tratamentos					
	Célula Livre (C)		T0,5%		T2%	
	Qtde.	%	Qtde.	%	Qtde.	%
Leite (L)	7	86,43	7	86,43	7	86,43
Açúcar cristal (g)	700	10	700	10	700	10
Sucralose (g)	5,81	0,083	5,81	0,083	5,81	0,083
Inulina (g)	210	3	210	3	210	3
Bicarbonato de Sódio (g)	4,0	0,06	4,0	0,06	4,0	0,06
Microcápsulas (g)	-	-	30	0,43	30	0,43
Probiótico livre em solução (mL)	30	0,43	-	-	-	-
Total (Kg)	8,167	100	8,167	100	8,167	100
Rendimento (Kg)	2,200	26,93	2,226	27,25	2,231	27,31

C – Célula probiótica livre, sem microcápsula

T0,5% – Microcápsula com sobrecamada de 0,5% de WPC

T2% – Microcápsula com sobrecamada de 2,0% de WPC

Quadro 1 – Formulações do doce de leite *light* nos tratamentos adicionados de *Enterococcus faecium* na forma de célula livre (C) e microencapsulados com sobrecamada de 0,5% (T0,5%) e 2% (T2%) de concentrado proteico de soro de leite

A acidez do leite e a densidade foram determinadas previamente à fabricação do doce, utilizando-se a técnica da titulação com solução Dornic e termolactodensímetro (BRASIL, 2006). A determinação da gordura na matéria prima não foi realizada, pois considerou-se valor de 0,5%, valor máximo de gordura permitido para leite desnatado (BRASIL, 2003).

Primeiramente, antes da cocção, a acidez do leite foi corrigida com o uso de bicarbonato de sódio, até atingir valor de 10 °Dornic (1 °Dornic é equivalente a 0,1 g de ácido láctico/ L leite), de acordo com fórmula empregada por Martins e Lopes (1981). O produto foi elaborado em tacho aberto por cocção em fogão industrial. Os ingredientes foram adicionados conforme mostra o fluxograma abaixo (Figura 6).

As três bateladas de doce de leite (C, T0,5% e T2%) foram processadas de acordo com o procedimento tradicional de fabricação (SÁ et al., 2012), através de concentração em tacho aberto de camisa dupla, fabricado em aço inox, utilizando fogão industrial como fonte de calor. O rendimento foi calculado através do somatório da massa inicial dos ingredientes e da massa de doce de leite obtida no final do processamento.

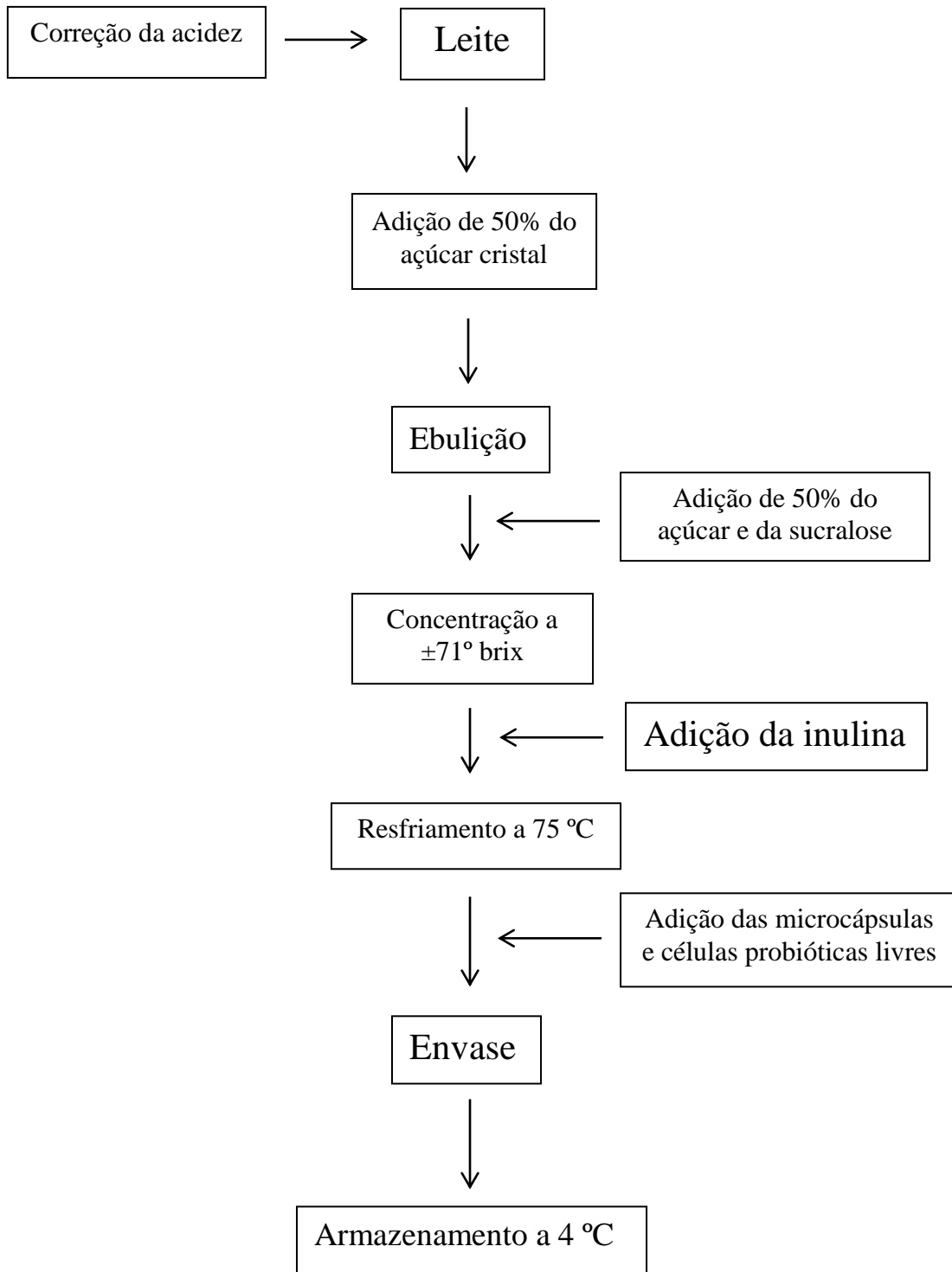


Figura 6 – Fluxograma de produção do doce de leite *light*.

Fonte: Autor (2015).

O doce de leite foi mantido sob agitação manual constante durante toda cocção, até atingir a concentração de sólidos solúveis de  $\pm 71^\circ$  Brix, determinada por refratômetro a  $25^\circ\text{C}$ . Após a determinação do ponto do doce, a inulina foi diluída em 200 mL de leite e foi

adicionada ao produto, permanecendo em temperatura elevada até sua homogeneização. Com a obtenção do ponto desejado, em torno de 75 °Brix cessou-se a cocção e o produto resfriou até atingir 75 °C, momento que as microcápsulas e as células probióticas livres foram adicionadas, homogeneizadas e o doce de leite foi envasado e armazenado. O tratamento C recebeu 30 mL de células probióticas de *E. faecium* livres, sem a microcápsula, com contagem de 11,6 Log UFC·mL<sup>-1</sup>. O tratamento T0,5% recebeu 30 g de microcápsulas probióticas com sobrecamada de 0,5% de concentrado proteico de soro do leite (WPC) com contagem de 11,3 Log UFC·g<sup>-1</sup> e o tratamento T2% recebeu 30 g de microcápsulas probióticas com sobrecamada de 2% de WPC com contagem de 11,3 Log UFC·g<sup>-1</sup>.

Os recipientes utilizados para envase do produto foram potes plásticos de 250 g, previamente esterilizados na luz UV e o armazenamento foi feito sob refrigeração de ±4 °C, durante 90 dias.

### **3.7 Viabilidade do probiótico *E. faecium* durante a vida do doce de leite *light***

Os três tratamentos de doce de leite foram armazenados por 90 dias em temperatura de refrigeração a ±4 °C, pois estudos demonstraram que a sobrevivência e a maior viabilidade microbiana durante o armazenamento são obtidas em baixas temperaturas de estocagem (GARDINER et al., 2000).

A análise de viabilidade das células probióticas durante a vida de prateleira do produto foi feita através de contagem bacteriana de *E. faecium* em meio MRS. Uma alíquota de 25 g do doce leite elaborado foi homogeneizada com 225 mL de solução tampão fosfato pH 7,5 estéril, em saquetas estéreis, e agitadas no Bag Mixer (Marconi<sup>®</sup>) por 5 min. a 200 RPM. Em seguida, realizou-se diluição decimal seriada em tubos contendo solução salina 0,85% estéril e plaqueamento das diluições em meio MRS. As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose em estufa bacteriológica a 37 °C, por 72 h. A análise de viabilidade do probiótico durante a vida de prateleira foi realizada no dia 0 (dia de fabricação) e a cada 15 dias até o final do período de armazenamento, para todos os tratamentos.

### **3.8 Análise microbiológica do doce de leite *light* contendo *E. faecium* livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC**

Foram realizadas análises para a presença dos seguintes microrganismos, determinados por legislação: fungos filamentosos e leveduras, *Staphylococcus aureus*

coagulase positiva, coliformes fecais e *Salmonella* (BRASIL, 2001; BRASIL, 2003a). Essas análises foram realizadas no dia 0 (D0-dia de fabricação) e, para as amostras que apresentaram contagens, a cada 15 dias, até o dia 90, segundo metodologia preconizada pela legislação brasileira. Todas as análises microbiológicas foram feitas diluindo-se uma amostra de 25 g do produto em 225 mL de solução salina 0,85% estéril. A partir disso, foram feitas diluições decimais seriadas até  $10^{-6}$ .

A contagem de bolores e leveduras foi realizada por plaqueamento em superfície de 0,1 mL da diluição em meio ágar batata dextrose (PDA HIMEDIA<sup>®</sup>) 2% acidificado (pH 3,5%), incubado a 25 °C por cinco a sete dias. A determinação de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva realizou-se através do plaqueamento em superfície de 0,1 mL da diluição em ágar Baird-Parker (BP HIMEDIA<sup>®</sup>) com incubação à 37 °C por 48 horas. Após, as colônias típicas foram semeadas em caldo de infusão cérebro-coração (BHI HIMEDIA<sup>®</sup>) para o teste de coagulase em plasma de coelho (COAGU-PLASMA LB, LABORCLIN<sup>®</sup>). Para avaliar a presença de coliformes termotolerantes, foi utilizada a técnica de plaqueamento em profundidade de 1 mL da diluição no meio de cultura Ágar Vermelho Violeta Bile com Glicose (VBR HIMEDIA<sup>®</sup>) incubado a 37 °C por 48 horas, sendo os resultados expressos em UFC·mL<sup>-1</sup>. A análise para *Salmonella spp.* realizou-se através do pré-enriquecimento da amostra em água peptonada tamponada (HIMEDIA<sup>®</sup>) a 37 °C por 24 horas. Após foi feito um enriquecimento seletivo em caldo Tetracionato e Rappaport (Prolab<sup>®</sup>), incubados em estufa por 42,5 °C durante 24 horas. Posteriormente, cada caldo foi semeado em ágar SS (*Salmonella Shigella*) e ágar Rambach (HIMEDIA<sup>®</sup>)<sup>®</sup> e as placas incubadas a 37 °C por 24 horas. As colônias típicas foram submetidas a provas bioquímicas para identificação (BRASIL, 2001; BRASIL, 2003a).

### **3.9 Análises físico-químicas do doce de leite *light* contendo *E. faecium* livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC**

As análises de composição química realizadas foram aquelas preconizadas pela legislação brasileira para produtos lácteos (BRASIL, 2011). A extração e quantificação de lipídeos totais foram efetuadas através da técnica de Hara e Hadin (1978). As determinações de proteína, umidade e cinzas foram realizadas segundo metodologia descrita pela AOAC (AOAC, 2005). A umidade foi determinada após secagem em estufa a 105° C por 4 horas. O teor de cinzas foi determinado após calcinação das amostras em mufla a 550° C por 6 horas (AOAC, 2005; BRASIL, 2003a; BRASIL, 1997; BRASIL, 2006). A quantificação de

carboidratos totais e carboidratos não fibrosos foi feita por diferença e a determinação de fibra alimentar foi feita através de cálculos sobre a porcentagem de inulina utilizada na fabricação do doce de leite *light*. O valor calórico foi calculado utilizando os valores de 4 Kcal·g<sup>-1</sup> para carboidratos não fibrosos e proteína, 9 Kcal·g<sup>-1</sup> para os lipídeos (BRASIL 2003b) e 1,5 Kcal·g<sup>-1</sup> para fibra alimentar (ZULETA; SAMBUCETTI, 2001). Os ensaios de composição química foram realizados para todos os tratamentos somente no dia de produção do doce (D0).

A análise de perfil de textura instrumental foi realizada em texturômetro (TA-XTplus, Stable Micro Systems<sup>®</sup>) com probe cilíndrica de acrílico de 36 mm (Figura 7A). Os parâmetros utilizados foram velocidade de pré-teste de 2.0 mm·s, velocidade de teste de 1.0 mm·s e velocidade de pós-teste de 2.0 mm·s, penetração de 10.0 mm, tempo de 0.5 s e força de 5.0 g (GUIMARÃES et al., 2012a).

As análises colorimétricas foram realizadas em colorímetro (Konica Minolta<sup>®</sup> CR 310 Chroma Meter JP) (Figura 7B), que utiliza o sistema de cores CIE L\* a\* b\*, determinando os valores de luminosidade (L\*), intensidade da cor vermelha (a\*) e intensidade da cor amarela (b\*). A textura e a cor foram avaliadas para todos os tratamentos durante toda a vida de prateleira do doce de leite, nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90.

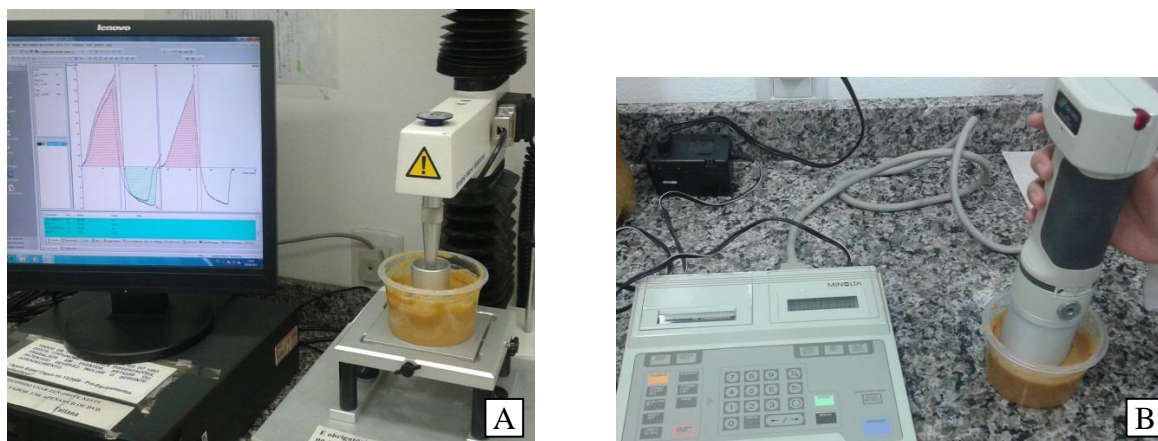


Figura 7 – Texturômetro (A) e colorímetro (B) utilizados na análise de textura e de cor do doce de leite *light* com adição de sucralose, inulina e microcápsulas probióticas.

Fonte: Autor (2015).

### 3.10 Análise estatística

Os dados foram analisados através do programa estatístico SAS<sup>®</sup> - Statistical Analysis System, versão 9.1. Para os dados de caracterização de composição química da cápsula e do doce de leite *light* utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado. Quando verificado

efeito de tratamento na análise de variância ao nível de 5% de significância, as médias foram ajustadas pelo método dos quadrados mínimos, LSMEANS e comparadas pelo teste de Tukey.

Para analisar os dados de resistência gastrointestinal *in vitro*, utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial 4 (tratamentos C, T0%, T0,5% e T2%) x 4 (tempos T0, T30, T60 e T120) x 2 (pH 2,5 e pH 7,5).

Os resultados do tratamento térmico e da vida de prateleira (viabilidade do probiótico, análise microbiológica, análise de textura e de cor) que foram realizados durante 90 dias de armazenamento do doce de leite *light* foram analisados através do delineamento inteiramente casualizado com medida repetida no tempo utilizando o procedimento MIXED do SAS. O modelo incluiu os efeitos fixos do tratamento, o tempo de armazenagem e a interação tratamento x tempo. As comparações das médias, tanto no interior de cada dia de armazenamento e entre os diferentes dias e tratamentos, foram realizados pelo teste Tukey ajustado em um nível de significância de  $P \leq 0,05$ .





## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Composição química das microcápsulas probióticas contendo *E. faecium*

A metodologia de recobrimento utilizada para a elaboração da microcápsula, com sobrecamada de concentrado proteico de soro do leite (WPC), elevou significativamente os níveis de proteína dos tratamentos T0,5% e T2% em relação ao T0% (Tabela 5). Pode-se dizer que houve interação química entre a matriz de alginato e o WPC, que ficou adsorvido na microcápsula em quantidades significativas.

Tabela 5 – Análise de proteína adsorvida na microcápsula elaborada com alginato de sódio de baixa viscosidade, com e sem sobrecamada de WPC, através da técnica de gelificação iônica.

Tratamentos	Proteína capsular (%)
T0%	0,49 <sup>C</sup>
T0,5%	5,28 <sup>B</sup>
T2%	7,16 <sup>A</sup>

EP = 0,052, P < 0,0001.

T0%: microcápsula sem sobrecamada de WPC.

T0,5%: microcápsula com sobrecamada de 0,5% de WPC.

T2: microcápsula com sobrecamada de 2% de WPC.

Essa interação entre o alginato e a proteína ocorre devido a ligações eletrostáticas entre o polissacarídeo e o aminoácido. Em pH abaixo de 4,5 a proteína apresenta grande quantidade de cargas positivas, devido a protonação dos grupamentos amino, desse modo ocorre a formação de pares iônicos entre a proteína e as carboxilas do ácido algínico (NOGUEIRA, 2013). Quanto menor o pH, maior a protonação dos grupos amino, aumentando a interação entre as moléculas de proteína e polissacarídeo (SANTOS, 2014).

As proteínas apresentam carga líquida negativa acima do seu ponto isoelétrico (pI) e carga líquida positiva abaixo do pI, enquanto que os polissacarídeos aniônicos tem carga negativa máxima em valores de pH bem acima do seu pKa, mas perdem progressivamente essa carga a medida que o pH é reduzido (JONES; DECKER; McCLEMENTS, 2010). A carga líquida negativa do alginato é proveniente dos grupamentos carboxilas carregado negativamente (COO-) ao longo dos blocos D-manurônico e L-gulurônico (BAJPAI; TANKHIWALE, 2006).

Sabe-se que o pH exerce uma grande influência na intensidade da interação eletrostática, pois este determina o grau de ionização dos grupos laterais (grupos amina e

carboxílico) dos biopolímeros afetando sua carga total (SCHMITT et al., 1998; SCHMITT et al., 1999). A medida que o pH é reduzido abaixo do pI da proteína, tende-se a formar complexos insolúveis ou coacervados, devido à forte interação entre as cargas opostas (JONES; DECKER; McCLEMENTS, 2010).

Na Tabela 5, observa-se que houve diferença significativa ( $P < 0,0001$ ) entre os três tratamentos, onde quanto maior a concentração de WPC da solução de recobrimento, maior foi a incorporação de proteínas na sobrecamada da microcápsula. Nogueira (2013) recobriu microcápsulas de alginato com concentrações de 0,6%, 3% e 4% de WPC em diferentes pH (3,5 e 3,75), e obteve resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho, ou seja, a cápsula que apresentou maior porcentagem de proteína em sua composição, foi a que recebeu o recobrimento de WPC mais concentrado. O valor total de proteínas adsorvidas na partícula, variou de 51,20% a 64,91% quando utilizado WPC a 4% (NOGUEIRA, 2013).

Segundo De Vos et al. (2006), em consequência da natureza hidrofílica do alginato, as microcápsulas possuem elevada capacidade de retenção de água ( $> 95\%$ ). Mukai-Corrêa et al. (2003), encontrou valores de umidade superiores a 90% para microcápsulas obtidas por gelificação iônica. Nesse estudo encontramos diferença significativa entre os tratamentos T0,5% ( $95,62\% \pm 0,09$ ), T2% ( $94,50\% \pm 0,09$ ) e T0% ( $94,92\% \pm 0,09$ ). Esses resultados se mostraram semelhantes a outros estudos que analisaram a umidade das microcápsulas de alginato, obtidas por gelificação iônica externa pela técnica de extrusão, e encontraram resultados em torno de 93 a 99% de umidade (BOSCARIOLI, 2010; ECTHEPARE, 2014; NOGUEIRA, 2013).

Observa-se que o tratamento que recebeu sobrecamada proteica de 2% apresentou menor valor de umidade, conforme Tabela 6. Nogueira (2013) também observou uma diminuição significativa no teor de umidade das microcápsulas de alginato que receberam as multicamadas proteicas, variando de 87,6 para microcápsulas com sobrecamada de 4% de WPC a 92,3% para aquelas com sobrecamada de 1,7% de WPC em pH 3,75.

Quanto os valores de atividade de água das microcápsulas úmidas, não foram observadas diferenças estatísticas. Os valores encontrados estão representados na Tabela 6.

Boscarioli (2010) e Etchepare (2014) relatam valores de atividade de água em torno de 0,995 e 0,990 respectivamente, para microcápsulas de alginato produzidas por extrusão, corroborando com os resultados deste trabalho.

A atividade de água é um fator intrínseco que possibilita avaliar a disponibilidade de água livre que é suscetível a diversas reações, ao passo que o teor de umidade é uma medida

meramente quantitativa, avaliando o percentual em peso da água total presente no alimento, tanto livre quanto ligada (SCOTT, 1957).

Tabela 6 – Análise de atividade de água e umidade das microcápsulas elaboradas com alginato de sódio de baixa viscosidade, com e sem sobrecamada de WPC, através da técnica de gelificação iônica.

Tratamento	Atividade de água*	Umidade**
T0%	0,995 ( $\pm 0,0034$ )	94,92% ( $\pm 0,09$ ) <sup>B</sup>
T0,5%	0,998 ( $\pm 0,0034$ )	95,62% ( $\pm 0,09$ ) <sup>A</sup>
T2%	0,998 ( $\pm 0,0034$ )	94,50% ( $\pm 0,09$ ) <sup>C</sup>

DP=Valor entre parêntesis, \*P=0,535, \*\*P<0,0001

T0%: microcápsula sem sobrecamada de WPC.

T0,5%: microcápsula com sobrecamada de 0,5% de WPC.

T2%: microcápsula com sobrecamada de 2% de WPC.

Segundo Anal e Singh, (2007), a fim de manter a viabilidade dos probióticos, a atividade de água deveria ser mantida a menor possível, pois a viabilidade celular dos probióticos diminui com o aumento da atividade de água. Isso ocorre porque a elevada atividade de água propicia o crescimento de microrganismos prejudiciais, assim como reações bioquímicas indesejáveis, o que afeta a sobrevivência das culturas probióticas durante o armazenamento (YING et al., 2010). Foi relatado que atividade de água menor que 0,3 e teor de umidade inferior a 5% é essencial para uma boa sobrevivência dos probióticos durante o armazenamento (CHÁVEZ; LEDEBOER, 2007).

Apesar de obtermos microcápsulas com elevado grau de umidade e de atividade de água, acima dos preconizados pela literatura, esses fatores não prejudicaram a viabilidade do microrganismo probiótico. Como as microcápsulas foram adicionadas em doce de leite *light*, a fim de se obter uma melhor apresentação e textura do doce, foi optado por adicionar as cápsulas úmidas ao produto. No entanto, uma alternativa simples e rápida para diminuir os valores de umidade e atividade de água das partículas seria submetê-las a liofilização.

#### 4.2 Eficiência da microencapsulação

A microencapsulação por gelificação iônica, através da técnica de extrusão, apresentou 89,4% eficiência de microencapsulação. A contagem inicial de *E. faecium* viáveis nas microcápsulas foi de 11,60 Log UFC·g<sup>-1</sup>, pouco superior ao encontrado por Pérez-Chabela (2009), que relata contagem de 9 Log UFC·g<sup>-1</sup> na microencapsulação de *E. faecium* por *spray drying*. A eficiência de microencapsulação obtida nesse experimento foi bem superior a outros

que também utilizaram a técnica de extrusão, seguida de liofilização, e obtiveram resultados entre 19,5% a 40,2% de eficiência, com perda de até 4 Log na viabilidade das células (CHAN et al., 2011; CHÁVARRI et al., 2010). Também se mostra superior ao resultado obtido pelo método de gelificação iônica interna, que foi de 74,41% de eficiência de microencapsulação (MARTIN et al., 2013). As microcápsulas obtidas estão representadas na Figura 8.



Figura 8 – Microcápsulas dos tratamentos T0%, T0,5% e T2% (da esquerda para a direita) obtidas por gelificação iônica através de bico extrusor de 3  $\mu$ m.

Fonte: Autor (2015).

No entanto, os resultados encontrados nesse trabalho, com a metodologia de gelificação iônica externa, assemelham-se aos encontrados por Nogueira (2013), que apresentaram entre 92,6 a 94,8% de eficiência de microencapsulação, pela técnica de gelificação iônica e por Castro-Cislaghi, Fritzen-Freire e Sant'Anna (2012), que obtiveram eficiência de 84,01% a 90,85 %, pela técnica de *spray drying*.

Picot e Lacroix (2004), observaram que o rendimento da microencapsulação, além de ser dependente da cepa e do agente encapsulante, também é influenciado pelo método empregado. Por isso, os resultados de comparação de diferentes estudos, usando distintos microrganismos, são limitados, mesmo quando é usada a mesma técnica (MARTIN et al., 2013).

### 4.3 Capacidade termotolerante das microcápsulas probióticas contendo *E. faecium*

Na Tabela 7, podemos observar que as células de *E. faecium* que receberam a proteção da microcápsula (T0,5% e T2%) conseguiram resistir a ação do calor e não perderam a viabilidade, diferentemente das células probióticas livres, que tiveram redução acentuada, de 8 a 9 Log pela ação do calor e do tempo que permaneceram sob estresse térmico.

Tabela 7 – Viabilidade de *Enterococcus faecium* microencapsulados (Log UFC·g<sup>-1</sup>), após aquecimento a 70 °C por 0, 15, 20 e 30 minutos.

	T0	T15	T20	T30	Média trat
C	11,60 <sup> aA</sup> (±0,33)	0,47 <sup> bC</sup> (±0,33)	0,20 <sup> bB</sup> (±0,33)	0,10 <sup> bC</sup> (±0,33)	0,26 (±0,19)
T0,5%	11,60 <sup> aA</sup> (±0,33)	9,79 <sup> bB</sup> (±0,33)	9,61 <sup> bA</sup> (±0,33)	8,21 <sup> cB</sup> (±0,33)	9,20± (0,19)
T2%	11,60 <sup> aA</sup> (±0,33)	11,0 <sup> aA</sup> (±0,33)	10,02 <sup> bA</sup> (±0,33)	9,28 <sup> bA</sup> (±0,33)	10,43(±0,19)
Média tempo	11,6 (±0,19)	7,42(±0,19)	6,61(±0,19)	5,86(±0,19)	

Erro padrão é o valor entre parêntesis

Efeito de tratamento: p=<0,0001, Tempo: p = 0,0007 , Tempo\*tratamento: p = 0,0275

C – célula de *E.faecium* livre.

T0,5% - célula de *E.faecium* microencapsulada com sobrecamada de 0,5% de WPC.

T2% - célula de *E.faecium* microencapsulada com sobrecamada de 2% de WPC.

Letras maiúsculas comparação na coluna / minúscula nas linhas. Letras iguais não difere estatisticamente.

Para o tratamento controle (C), observou-se uma redução acentuada da viabilidade do microrganismo de 11,13 Log UFC·g<sup>-1</sup> já nos primeiros 15 minutos de aquecimento (Tabela 7) e não apresentou diferença significativa (P=0,0275) no decorrer dos 30 minutos de aquecimento. Isso ocorre pelo fato de que os microrganismos não estão protegidos pela microcápsula. Esses resultados discordam dos encontrados por Ramírez-Chavarín et al. (2010), que relatam que *E. faecium* foi isolado normalmente de produtos submetidos a altas temperaturas, suportando até 70°C por 30 min. Apesar do *E. faecium* apresentar boa capacidade termotolerante (RAMÍREZ-CHAVARÍN et al., 2010), a célula livre não manteve viabilidade após 15 min. à temperatura de 70 °C.

No tratamento T0,5% houve redução significativa (P=0,0275) na contagem de *E. faecium* microencapsulado. A redução foi de 1,81 Log UFC·g<sup>-1</sup>, 1,99 Log UFC·g<sup>-1</sup> e 3,39 Log UFC·g<sup>-1</sup> em 15, 20 e 30 minutos de aquecimento a 70 °C., respectivamente (Tabela 7). A maior redução na viabilidade do microrganismo microencapsulado com alginato de sódio, que recebeu sobrecamada de 0,5% de WPC, foi durante o aquecimento de 30 minutos (3,39 Log

UFC·g<sup>-1</sup>), embora ainda tenha permanecido com uma contagem de 8,21 Log UFC·g<sup>-1</sup>. Quando a microcápsula recebeu sobrecamada de 2,0% de WPC (T2%), a redução foi ainda menor (2,32 Log UFC·g<sup>-1</sup>) aos 30 minutos de aquecimento. Essa proteção térmica que a cápsula conferiu às células probióticas, deve-se as propriedades do alginato de termotolerância, o que confere estabilidade à cápsula e ao microrganismo para serem adicionados em alimentos termicamente processados (GARCIA CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008).

Outros trabalhos demonstram que microcápsulas de alginato, obtidas por gelificação iônica externa, recobertas com sobrecamadas de WPC, mantiveram-se íntegras após o processo de esterilização (121 °C por 15 min.), com características morfológicas muito similares as partículas não esterilizadas. Segundo Nogueira (2013) essas partículas suportam até mesmo temperatura de esterilização.

#### 4.4 Teste de resistência *in vitro* das microcápsulas probióticas contendo *E. faecium* às condições gastrointestinais

Vários trabalhos demonstraram que a microencapsulação de probióticos aumenta a sobrevivência dos microrganismos no ambiente gástrico e intestinal (CHANDRAMOULI et al., 2004; LEE; HEO, 2000; SHEU; MARSHALL, 1993). Nesse trabalho, podemos perceber que a viabilidade dos probióticos foi alta, independentemente do tratamento utilizado.

Os resultados do teste gastrointestinal *in vitro*, com a viabilidade dos probióticos nos diferentes pHs e tempos está representado na Tabela 8.

Tabela 8 – Viabilidade probiótica (Log UFC·mL<sup>-1</sup>) de *Enterococcus faecium* microencapsulados com alginato de sódio, com e sem sobrecamada de concentrado proteico do soro de leite, durante o teste de resistência gastrointestinal *in vitro*.

Tratamento	pH 2,5			pH 7,5		
	T30	T60	T120	T30	T60	T120
C	10,70 <sup>Aa</sup>	10,49	10,39 <sup>Aa</sup>	11,13	10,22	10,03 <sup>Aa</sup>
T0%	7,11 <sup>Cb</sup>	3,50	7,02 <sup>Cb</sup>	7,39	5,10	9,30 <sup>Aa</sup>
T0,5%	10,26 <sup>Aa</sup>	8,02	5,38 <sup>Dc</sup>	7,59	7,37	7,51 <sup>Bb</sup>
T2%	8,89 <sup>Bac</sup>	9,57	8,26 <sup>Bc</sup>	7,90	9,32	9,59 <sup>Aa</sup>

CV: 3,48, DP: ±0,29, P<0,0001. C – célula de *E.faecium* livre.

T0% – célula de *E. faecium* microencapsulada somente com alginato, sem sobrecamada.

T0,5% - célula de *E.faecium* microencapsulada com sobrecamada de 0,5% de WPC.

T2% - célula de *E.faecium* microencapsulada com sobrecamada de 2% de WPC.

Letras maiúsculas comparação na coluna / minúscula nas linhas. Letras iguais não difere estatisticamente.

A análise estatística fatorial (Tratamento x Tempo x pH) mostrou interação entre todas as variáveis, com  $P < 0,0001$ , a partir disso, os resultados de interesse foram discutidos. A contagem probiótica no início do teste foi de  $11,38 \text{ Log UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ , para todos os tratamentos. Podemos perceber que ao término do teste de resistência gastrointestinal (Tabela 8), houve uma redução na viabilidade do probiótico, mas apesar disso, as contagens finais foram satisfatórias, acima do exigido por legislação para alimentos probióticos, que é pelo menos  $6 \text{ Log UFC} \cdot \text{g}^{-1}$  (FAO, 2001).

Estudos com microencapsulação de *B. longum* pela técnica de extrusão mostram que as células probióticas encapsuladas sobreviveram melhor no ambiente gástrico do que células livres. Esse índice de resistência aumentou ainda mais com a elevação da concentração de alginato e o tamanho da partícula (CHANDRAMOULI et al., 2004). No entanto, ao contrário do descrito na literatura, onde cepas de *E. faecium* protegidas por microencapsulação tiveram sobrevivência significativamente maior quando comparadas com células livres (PÉREZ-CHABELA et al., 2009), no presente trabalho não houve diferenças significativas na viabilidade do probiótico microencapsulado e da célula livre, com exceção do tratamento T0,5%, que diferiu dos demais apresentando baixas contagens (Tabela 8). Rao et al. (1989), Sultana, Godward e Reynolds (2000), Koo et al. (2001) e Trulestrup et al. (2002), descrevem que a encapsulação de bactérias não confere proteção efetiva frente as condições ácidas extremas.

Outro resultado inesperado foi a alta viabilidade das células do tratamento C (Figura 12), o qual não apresentou diferença estatística entre o T30 do pH 2,5 e o T120 do pH 7,5 (Tabela 8). Pensava-se que haveria uma redução significativa da viabilidade probiótica nesse tratamento, no decorrer do tempo. No entanto, foi observado exatamente o contrário, o tratamento C (Figura 12) foi o que apresentou a viabilidade final mais alta, sendo estatisticamente igual aos tratamentos T0% e T2% (Figuras 10 e 11), que receberam a microcápsula. Da mesma maneira, Sultana, Godward e Reynolds (2000), relataram que a sobrevivência de probióticos em microcápsulas de alginato e amido com 1 mm diâmetro não aumentou após a permanência em ambientes ácidos e com concentrações de sais biliares. O contrário ocorreu em outro estudo, no qual cepas de *E. faecium* protegidas por microencapsulação tiveram sobrevivência significativamente maior quando comparado com células sem proteção (PÉREZ-CHABELA et al., 2009).

Provavelmente esse fato tenha ocorrido, primeiramente pela alta resistência do *E. faecium* e seu marcado perfil probiótico, sendo capazes de sobreviver em pH gástrico e altas concentrações de sais biliares e enzimas. A resistência natural dessa bactéria em relação ao

pH e concentração salina, o tornam um excelente probiótico e propiciam a ocorrência de altas contagens de *E. faecium* na matéria fecal (FRANZ et al., 2011). Sabe-se que esse microrganismo é uma das espécies não esporuladas mais resistentes às condições adversas (RAMÍREZ-CHAVARÍN et al. 2010).

Diferentemente do encontrado nesse estudo, Lee e Heo (2000) relatam que a viabilidade de células probióticas de *B. longum*, sem cobertura capsular, decresceu rapidamente de 9 Log UFC·mL<sup>-1</sup> para menos de 3 Log UFC·mL<sup>-1</sup> em 30 min., quando expostas às condições gastrointestinais. E ainda, o tempo de exposição dos probióticos microencapsulados às condições gastrointestinais é diretamente proporcional à redução do número de células viáveis.

Também podemos perceber que a contagem bacteriana no pH 7,5 (Tabela 8), deveria ser maior que no pH 2,5 devido a dissolução da cápsula em pH básico, (ETCHEPARE, 2014; BOSCARIOLI, 2010) não diferiu estatisticamente no tratamento T2% (Figura 10). No tratamento T0,5% (Figura 9) foi significativamente menor no pH 7,5 que no pH 2,5 e somente no tratamento T0% (Figura 11) que as contagens do pH 7,5 foram significativamente maiores que no pH 2,5, como esperado. Neste caso, supõe-se que não houve o rompimento completo das microcápsulas, impossibilitando a liberação total dos microrganismos encapsulados. As análises de microscopia óptica de amostras das microcápsulas retiradas durante o teste *in vitro*, para o pH 2,5 e pH 7,5 mostram isso (Figuras 9, 10 e 11).

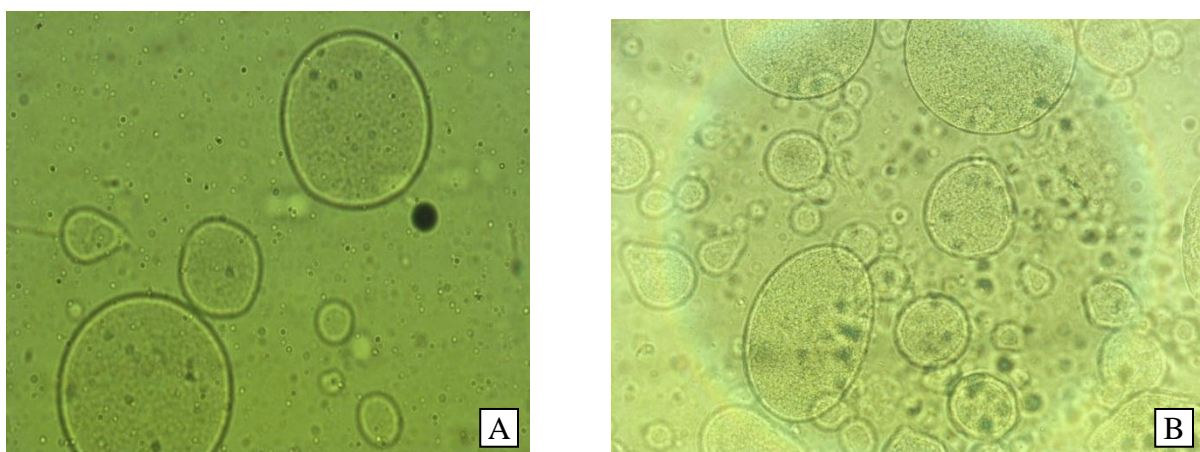


Figura 9 – Imagens de microscopia óptica (200x) das microcápsulas com sobrecamada de 0,5% de WPC, contendo *E. faecium*, após 120 minutos de exposição ao ambiente gastrointestinal simulado *in vitro*, em pH 2,5 (A) e pH 7,5 (B).

Fonte: Autor (2015).

Nogueira (2013) descreve que partículas elaboradas com multicamadas proteicas se mostraram parcialmente resistentes às condições gástricas, permanecendo estáveis em pH 4,0,



6,0 e 8,0. No entanto, em pH 2,0, foram sensíveis à atividade proteolítica promovendo a desintegração das multicamadas e com a ação da enzima pancreatina em ambiente intestinal simulado, houve liberação de aproximadamente 30% proteína da partícula. Esta liberação de proteína aparentemente não refletiu na morfologia das micropartículas. Nenhuma alteração significativa na morfologia das partículas foi observada após 1 h e 2 horas de simulação das condições gástricas, as quais ainda se encontravam íntegras, esféricas e densas. Após 24 h de simulação gastroentérica praticamente toda a proteína, 99%, da partícula foi liberada. Mesmo assim, as partículas de gelificação iônica ainda permaneceram parcialmente íntegras após 24 h de simulação, corroborando com os resultados encontrados nesse estudo.

As microcápsulas permaneceram intactas em pH 2,5 como já demonstrado (ETCHEPARE, 2014; NOGUEIRA, 2013). Entretanto, também demonstraram resistência ao pH 7,5, mesmo após os 120 min. (Figuras 9, 10 e 11). Desta forma, as multicamadas podem fornecer proteção a partícula de alginato e conseqüentemente ao material encapsulado em uma vasta gama de valores de pH (NOGUEIRA, 2013).

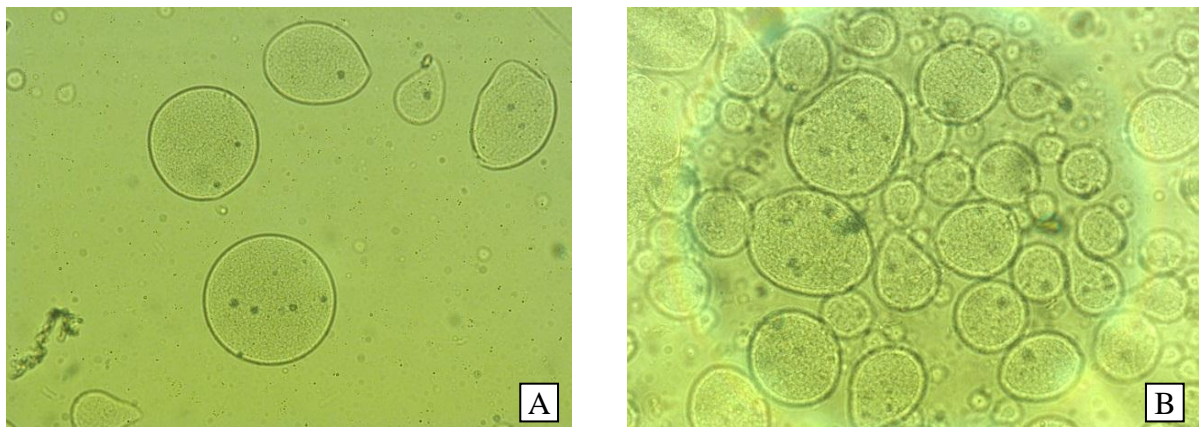


Figura 10 – Imagens de microscopia óptica (200x) das microcápsulas com sobrecamada de 2,0% de WPC, contendo *E. faecium*, após 120 minutos de exposição ao ambiente gastrointestinal simulado *in vitro*, em pH 2,5 (A) e em pH 7,5(B).

Fonte: Autor (2015).

Tiourina e Sukhorukov (2002) relataram que a proteína da sobrecamada não foi liberada quando as partículas foram incubadas em pH 1,7, durante 4 horas e nenhuma alteração na sua morfologia foi observada na microscopia. Entretanto, quando as microcápsulas foram transferidas para a solução tampão Tris, pH 8,0, cerca de 85% da proteína foi liberada dentro de 6 horas e, praticamente toda a proteína (95%) foi liberada em 12 horas.

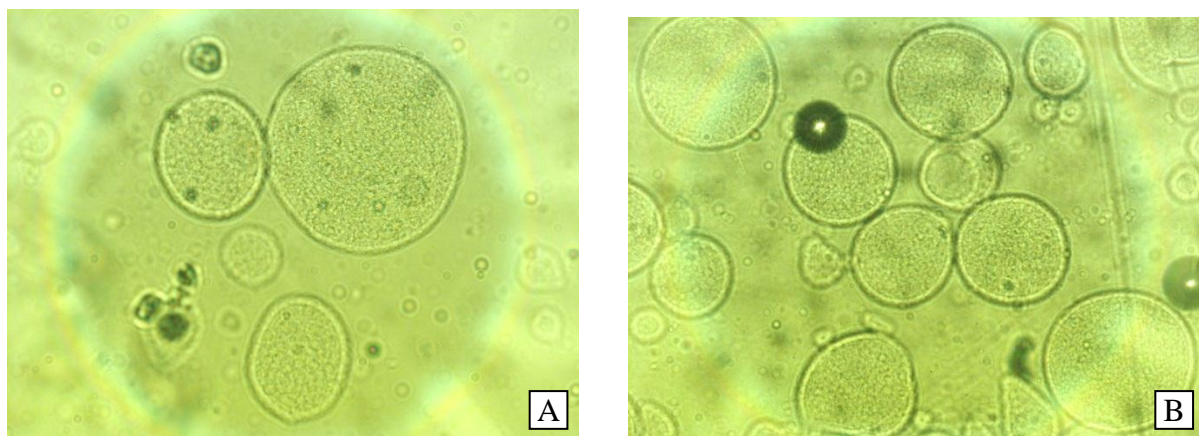


Figura 11 – Imagens de microscopia óptica (200x) das microcápsulas sem sobrecamada de WPC, contendo *E. faecium*, após 120 minutos de exposição ao ambiente gastrointestinal simulado *in vitro*, em pH 2,5 (A) e pH 7,5 (B).

Fonte: Autor (2015).

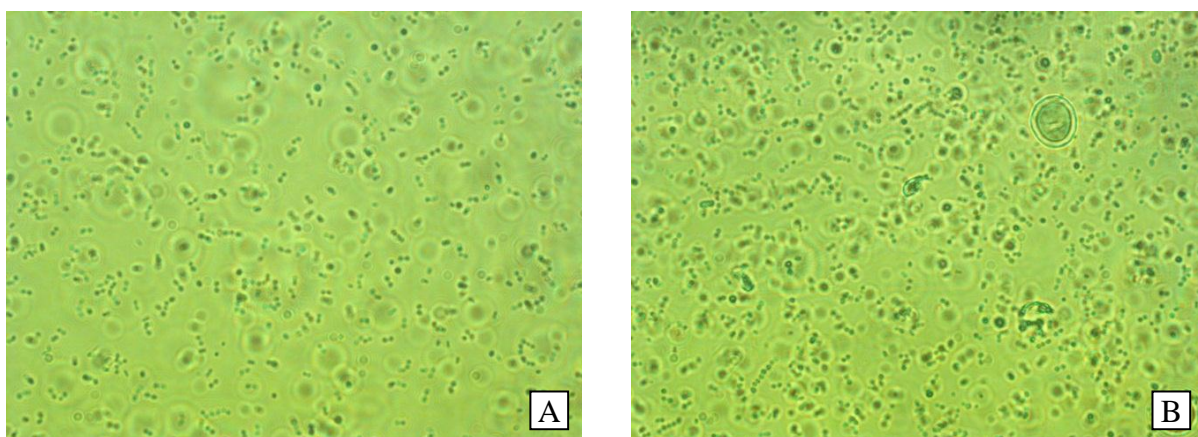


Figura 12 – Imagens de microscopia óptica (1000x) das microcápsulas contendo *E. faecium* livre, após 120 minutos de exposição ao ambiente gastrointestinal simulado *in vitro*, em pH 2,5 (A) e pH 7,5 (B).

Fonte: Autor (2015).

Provavelmente não tenha ocorrido a liberação da microcápsula por dois motivos: primeiro, porque a metodologia utilizada não foi a adequada para a liberação deste tipo de cápsula, devido a estrutura da partícula, ao pouco tempo de exposição às soluções de simulação e a inexistência de forças mecânicas mais intensas que auxiliassem no rompimento da cápsula. Quando as cápsulas foram adicionadas a tampão fosfato pH 7,5 e submetidas a força mecânica no Bag Mixer a 150 RPM por 2 min. observou-se que todas as estruturas capsulares foram desfeitas, visualizando-se somente células livres e artefatos, conforme Figura 13.

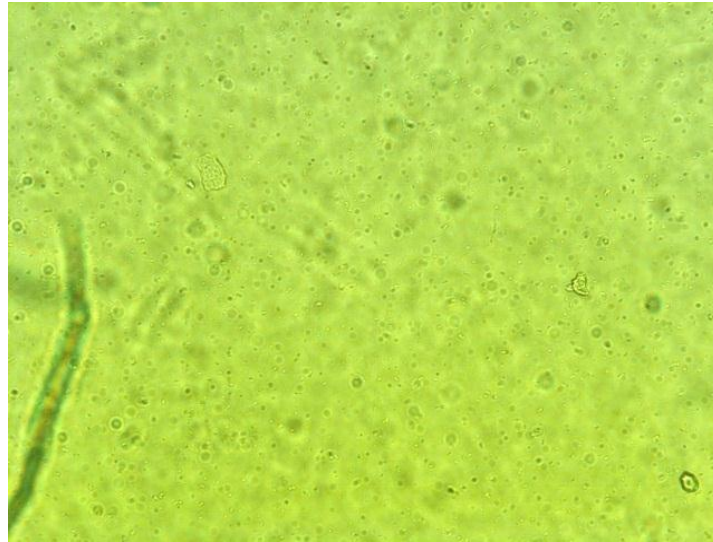


Figura 13 – Imagens de microscopia óptica (1000x) das microcápsulas contendo *E. faecium*, após a liberação em tampão fosfato pH 7,5.

Fonte: Autor (2015).

O outro motivo que pode ter contribuído para que não houvesse rompimento das cápsulas em pH 7,5 foi a estrutura da partícula. Acredita-se que a sobrecamada proteica conferiu maior estabilidade química a microcápsula, pelas interações eletrostáticas entre a proteína e o alginato. Assim como descreve Yeo, Baek e Park (2001), Anal e Stevens (2005) e Patil et al. (2010) a resistência mecânica e a permeabilidade destas partículas podem ser melhoradas com a formação de uma ou mais camadas de polieletrólitos de cargas opostas sobre sua superfície. Vários estudos já demonstraram que uma cobertura proteica na microcápsula de alginato aumenta a viabilidade do probiótico no trato gastrointestinal. Sugere-se que isso possa ser causado devido às ligações iônicas fortes da estrutura do alginato e a proteína, tanto no interior quanto na superfície da microcápsula, mesmo em pH baixos (KOO et al., 2001; YU et al., 2001).

Desse modo, o pH de 7,5 não foi o suficiente para desfazer a estrutura do hidrogel de alginato e solubilizar as cápsulas. Ao analisarmos os resultados obtidos, podemos observar que o único tratamento que a contagem probiótica foi significativamente maior quando exposta ao pH 7,5 comparado ao pH 2,5 (Tabela 8), foi justamente no tratamento T0%, no qual a microcápsula não recebeu a sobrecamada de WPC, ficando assim a partícula mais porosa e o alginato mais exposto a ação do pH (MORTAZAVIAN et al., 2007; MOURA; RUBIRA; MUNIZ, 2008).

Silva et al. (2012) relatou que células probióticas livres, sem microcápsula, adicionadas em flan de chocolate, tiveram redução de  $10^{11}$  UFC·g<sup>-1</sup> para  $10^6$  UFC·g<sup>-1</sup> após

serem submetidas as condições gastrointestinais *in vitro*. Apesar da redução no produto de 5 Log UFC·g<sup>-1</sup>, ainda foi considerado que o probiótico teve boa viabilidade.

Embora alguns autores relatem que cápsulas de alginato são dissolvidas *in vitro*, isso não foi confirmado *in vivo* (IYER; KAILASAPATHY; PEIRIS, 2004; IYER; PHILLIPS; KAILASAPATHY, 2005). Há relatos que corroboram com nossos resultados onde microcápsulas de alginato permanecem intactas durante passagem gastrointestinal e não liberam a célula encapsulada, sendo esta excretada sem modificações nas fezes (MARTIN et al. 2013). Mais estudos são necessários para adequar a metodologia dos testes de resistência gastrointestinal *in vitro* à microcápsula elaborada e o mais importante, pesquisar se as microcápsulas formuladas no presente trabalho são capazes de liberar o probiótico *in vivo*.

#### **4.5 Análise morfológica das microcápsulas probióticas contendo *E. faecium***

A microscopia é uma ferramenta importante para analisar a produção e as características das microcápsulas, como estrutura externa e arranjo molecular (ALLAN-WOJTAS et al., 2008). Para avaliação morfológica em microscópio óptico foram utilizadas microcápsulas úmidas, a fim de observar a forma, o tamanho e a superfície das partículas. Para análise por microscopia eletrônica de varredura as microcápsulas precisaram ser liofilizadas previamente para visualização. O tamanho das micropartículas úmidas foi analisado para determinar se o método de microencapsulação foi adequado para formação de partículas pequenas e uniformes.

##### **4.5.1 Microscopia óptica**

Embora a microscopia óptica não seja o método ideal para avaliação da morfologia das microcápsulas, esta técnica serve como um instrumento de avaliação preliminar, por ser rápida, simples e de baixo custo (BERTOLINI, 1999).

A observação microscópica das partículas úmidas foi realizada com o intuito de determinar a morfologia externa, a estrutura interna, o tamanho, a superfície e a distribuição de recheio (microrganismos) na matriz microcapsular. Segundo Iyer e Kailasapathy (2005) a forma das microcápsulas de alginato desenvolvidas por gelificação iônica externa são uniformemente esféricas, com as bactérias distribuídas aleatoriamente na matriz de alginato.

A análise das microcápsulas por microscopia óptica (Figuras 14, 15 e 16) revelou partículas esféricas, com tamanho uniforme, de superfície lisa e com recheio distribuído por



toda a matriz, semelhante aos resultados encontrados por outros pesquisadores (BOSCARIOLI, 2010; ETCHEPARE, 2014; SANTOS, 2013).

A microencapsulação de *E. faecium* nos diferentes tratamentos foi eficiente, pois conforme as microfotografias (Figuras 14, 15 e 16) mostram, é possível visualizar a distribuição homogênea dos microrganismos em toda matriz encapsulante de alginato, corroborando com resultados de Maestrelli et al. (2008), Fávoro-Trindade, Pinho, Rocha, (2008).

Não foi possível detectar as proteínas da sobrecamada, aderidas na microcápsula, através do microscópio óptico, por isso, visualmente todos os tratamentos apresentaram-se semelhantes quanto as suas características, não havendo diferença morfológica significativa entre os diferentes tratamentos (Figuras 14, 15 e 16).

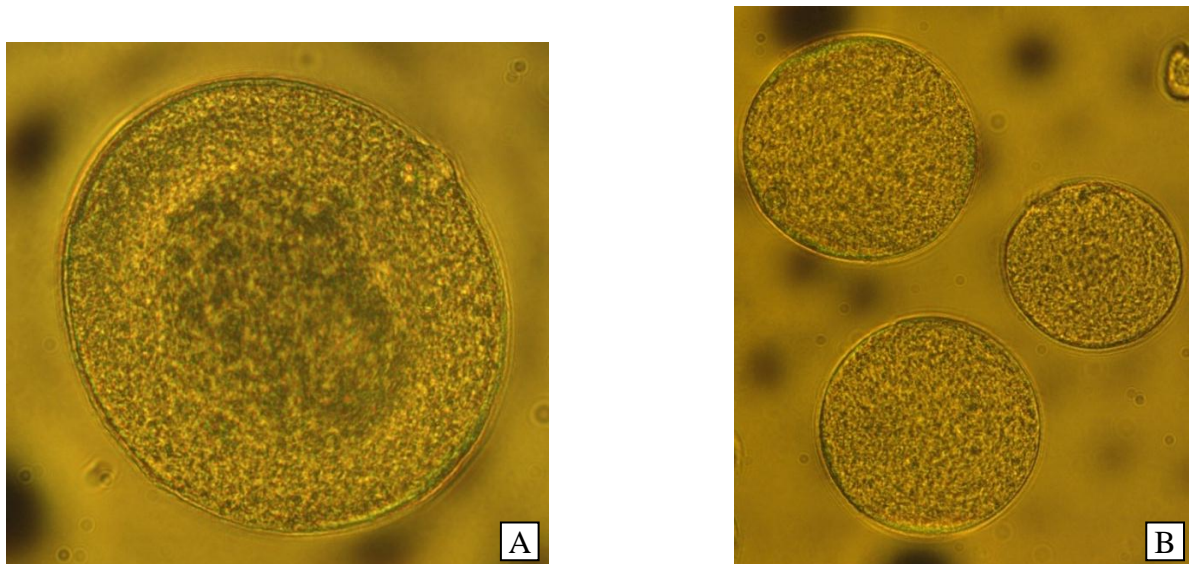


Figura 14 – Microfotografia óptica das microcápsula de alginato de sódio contendo *E. faecium*, sem sobrecamada de WPC em aumento de 400 vezes, (A) e 200 vezes (B).

Fonte: Autor (2015).

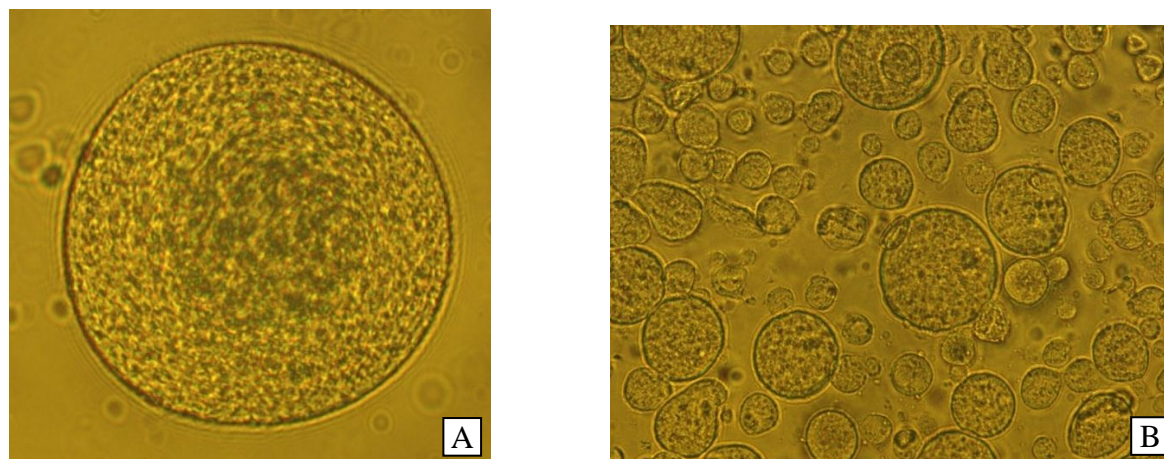


Figura 15 – Microfotografia óptica das microcápsulas de alginato de sódio contendo *E. faecium*, com sobrecamada de 0,5% de WPC em aumento de 400 vezes (A) e 200 vezes (B).

Fonte: Autor (2015).

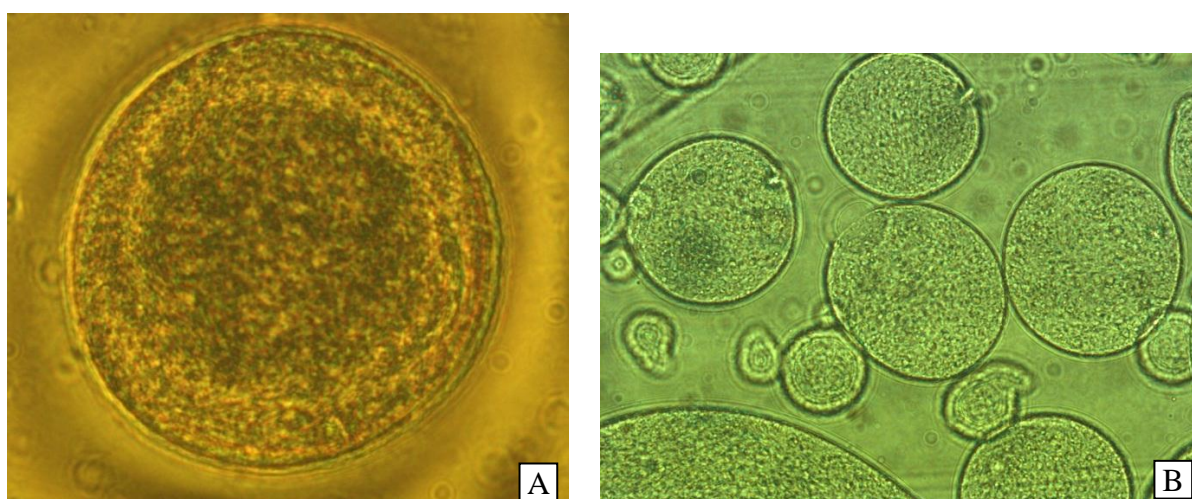


Figura 16 – Microfotografia óptica das microcápsulas de alginato de sódio contendo *E. faecium*, com sobrecamada de 2,0% de WPC em aumento de 400 vezes (A) e 200 vezes (B).

Fonte: Autor (2015).

#### 4.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (M.E.V)

Inúmeras técnicas de microscopia podem ser utilizadas na análise de microestruturas, porém, uma das rotineiramente mais empregadas é a microscopia eletrônica de varredura. Esta é uma importante ferramenta nos estudos de microencapsulação, principalmente para verificar a atuação dos revestimentos empregados, da sua funcionalidade, da massa das microcápsulas, além de outras imperfeições na matriz encapsulante (NIELSEN et al., 2007; ROSENBERG; KOPELMAN; TALMON, 1985). Entretanto, a interpretação de MEV é um

tanto subjetiva e exige um trabalho extensivo, para obtenção de um método quantitativo e confiável (NIELSEN et al., 2007).

Para visualização mais detalhada das partículas e com o objetivo de detectar diferenças estruturais entre os tratamentos, foi realizada a análise por microscopia eletrônica de varredura nas microcápsulas de alginato de sódio, contendo *E. faecium*, com ou sem sobrecamada de WPC (Figuras 17, 18 e 19).

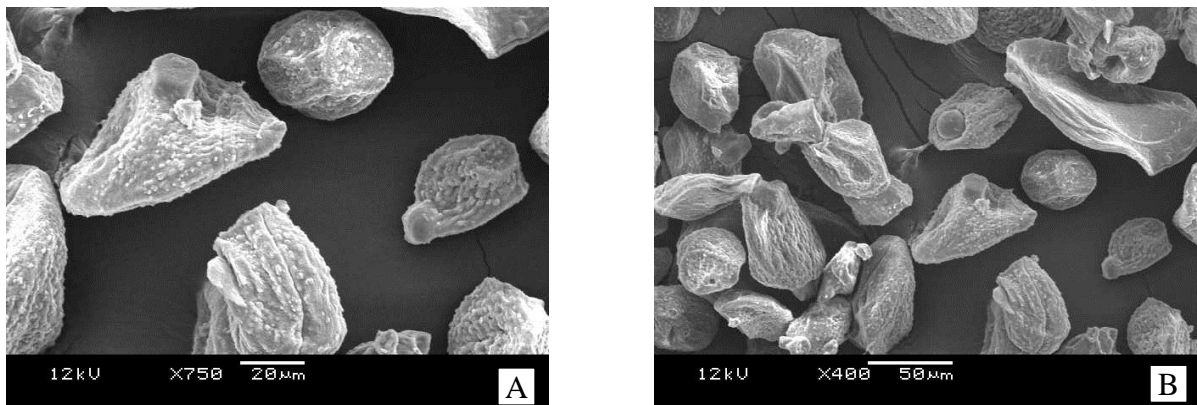


Figura 17 – Microfotografia de microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas do tratamento T0%, sem a sobrecamada de WPC, em aumento de 750 vezes (A) e 400 vezes (B).

Fonte: Autor (2015).

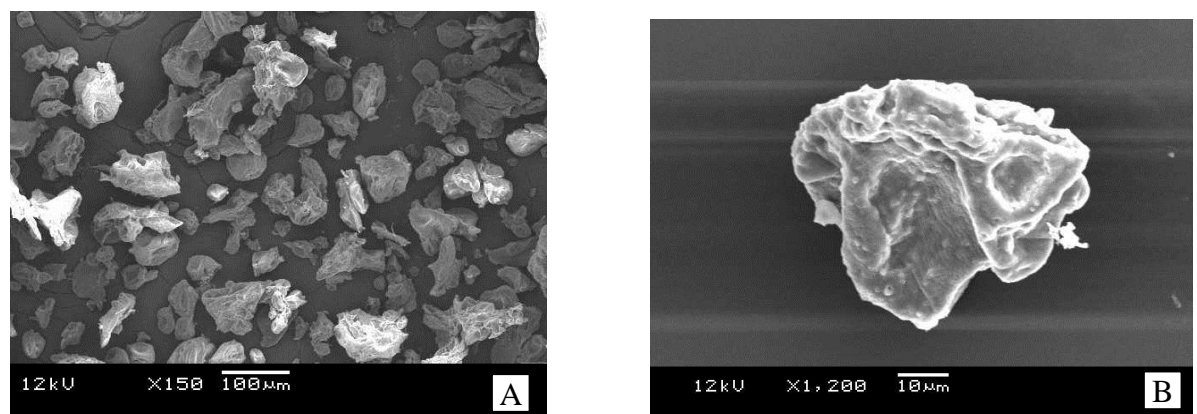


Figura 18 – Microfotografia de microscopia eletrônica de varredura de microcápsulas do tratamento T0,5%, com sobrecamada de 0,5% de WPC, em aumento de 150 vezes (A) e 1.200 vezes (B).

Fonte: Autor (2015).

Nas imagens obtidas visualiza-se perda da forma esférica visualizada na microscopia eletrônica, devido à liofilização (Figuras 17, 18 e 19). As partículas apresentaram formato heterogêneo, algumas esféricas, ovais, outras achatadas e alongadas, com superfície rugosa,

mais ou menos irregular, com concavidades, sem poros ou rachaduras. Foi relatado que micropartículas probióticas são mais ásperas e rugosas do que as microcápsulas sem bactérias (MARTIN et al., 2013).

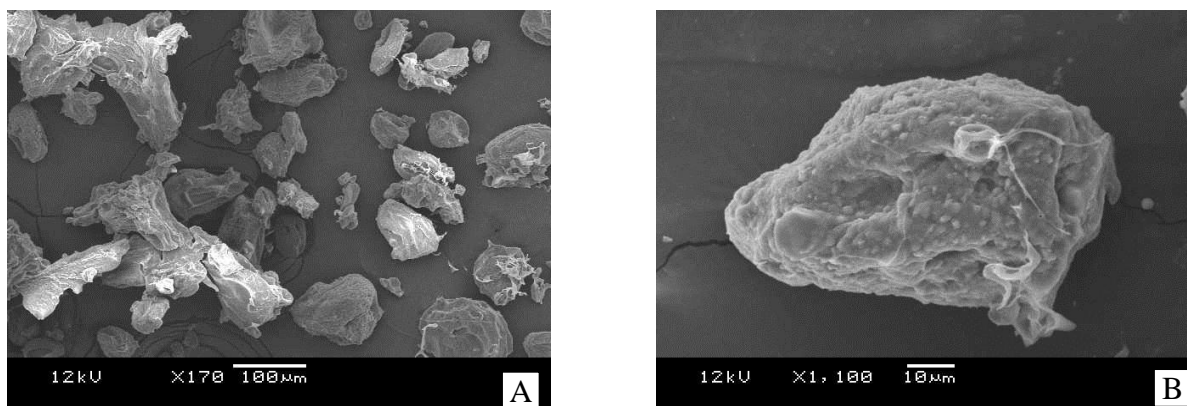


Figura 19 – Microfotografia de microscopia eletrônica de varredura de microcápsulas do tratamento T2%, com sobrecamada de 2,0% de WPC, em aumento de 170 vezes (A) e 1.100 vezes (B).

Fonte: Autor (2015).

Resultados semelhantes foram encontrados por Mukai-Corrêa (2003), que após liofilizar as partículas de alginato, carragena, goma gelana e pectina observou perda da estrutura esféricas das microcápsulas. Essa perda da estrutura capsular se deve à desidratação acentuada dos géis de polissacarídeos quando submetidos a liofilização (VEELKEN; PAPE, 1984). Devido às baixas temperaturas ocorre formação de cristais de gelo, os quais sublimam em pressão reduzida formando produtos secos e porosos (DOLLY et al., 2011). Esses defeitos na morfologia da microcápsula, que são vistos como concavidades ou depressões (Figuras 17, 18 e 19), são chamados de “efeito bola murcha” e são decorrentes da temperatura de exposição e material de que as partículas são formadas (LIAN; HSIAO; CHOU, 2002).

Percebe-se uma diferença muito sutil entre as microcápsulas que não receberam a sobrecamada, T0% (Figura 20 A) daquelas que receberam o recobrimento proteico, T0,5% e T2% (Figuras 20 B e 20 C). A primeira (Figura 20 A) demonstrou a superfície da partícula e o contorno mais regular, sem depressões. Já as últimas (Figuras 20 B e C), aparentam possuir superfície mais irregular, com depressões. No entanto, diferenças morfológicas entre os tratamentos T0,5% e T2% não foram perceptíveis. Resultados semelhantes também foram verificados por Nogueira (2013), que relata que a incorporação da primeira camada proteica sobre a partícula de alginato tornou sua superfície irregular, pressupondo-se que isso deve-se à camada proteica adsorvida. Nesse mesmo trabalho também foi observado que as diferentes



concentrações de WPC utilizadas nas sobrecamadas não alteraram a aparência das microcápsulas.

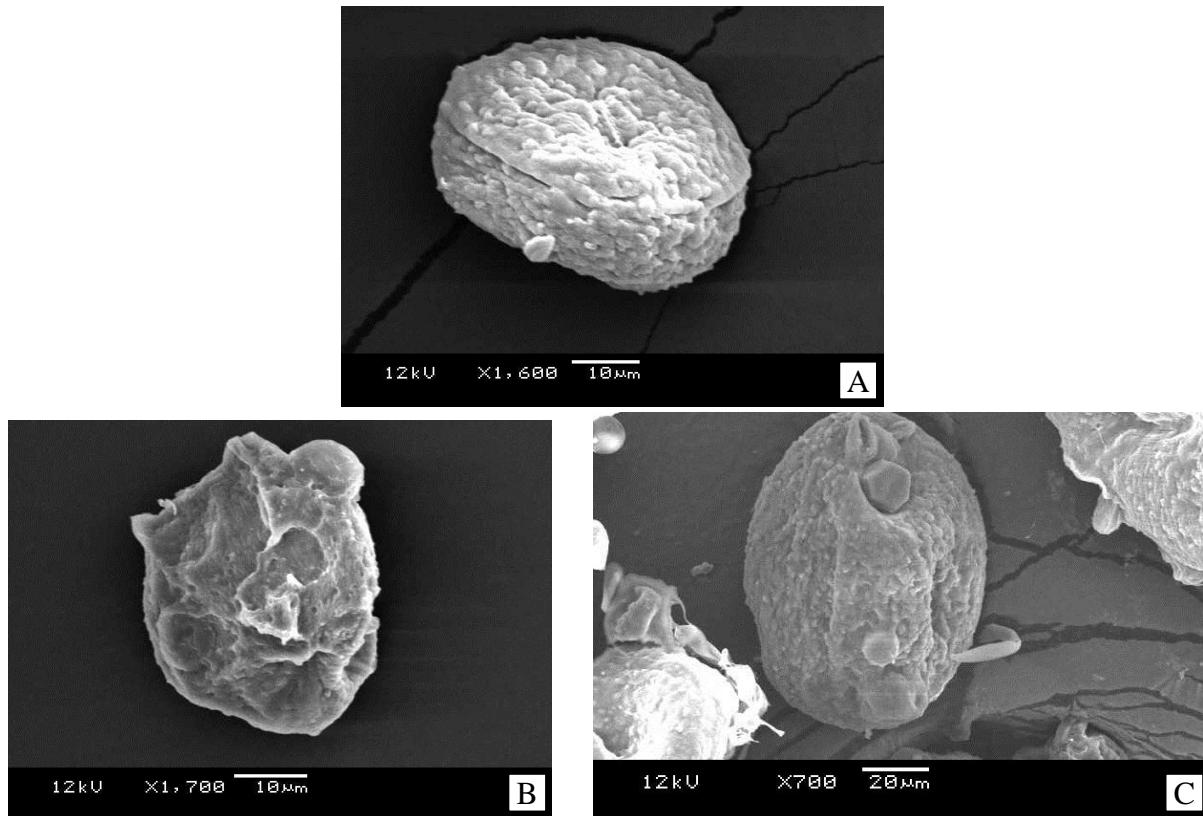


Figura 20 – Comparação da superfície das microcápsulas de alginato de sódio contendo *E. faecium*, dos tratamentos T0%, sem sobrecamada proteica (A), tratamento T0,5%, com sobrecamada de 0,5% de WPC (B) e tratamento T2%, com sobrecamada de 2,0% de WPC (C).

Fonte: Autor (2015).

#### 4.5.3 Tamanho das microcápsulas probióticas

Através da metodologia utilizada para a elaboração das micropartículas conseguiu-se alcançar bons diâmetros, com média de 101,3 µm até 157,26 µm, para os tratamentos com sobrecamada de 2% de WPC e sem sobrecamada, respectivamente (Figuras 21, 22 e 23). O tamanho das microcápsulas pode variar de *microns* até alguns milímetros, mas para aplicação em alimentos o diâmetro médio ideal das microcápsulas fica em torno de 100 µm (BURGAIN et al., 2011; COOK et al., 2012). Estas devem ter o tamanho suficiente para conferir proteção ao microrganismo, ao mesmo tempo que, devem ser pequenas o suficiente para evitar impacto sensorial negativo no produto (ANNAN; BORZA; TRUELSTRUP HANSEN, 2008; HANSEN et al., 2002; HEIDEBACH, 2009).

As microcápsulas sem sobrecamada de WPC (Figura 21) obtidas neste trabalho apresentaram distribuição média do tamanho de partículas de 157,26  $\mu\text{m}$ . Resultados muito semelhantes foram encontrados por Nogueira (2013), onde as partículas sem recobrimento apresentaram tamanhos médios entre 121,6 a 141,0  $\mu\text{m}$ .

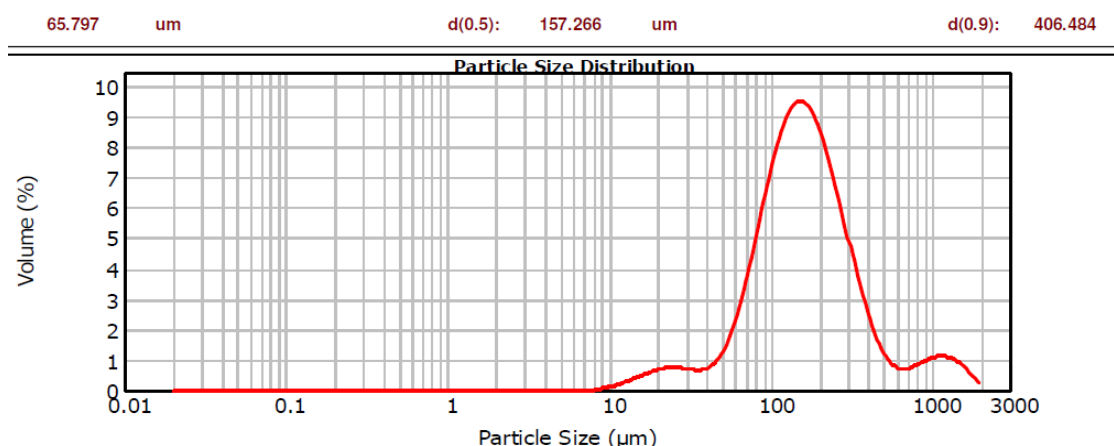


Figura 21 – Curva de distribuição média de tamanho das microcápsulas de alginato de sódio contendo *E. faecium*, do tratamento T0%, sem sobrecamada de WPC.

Fonte: Autor (2015).

As partículas que receberam a sobrecamada de WPC obtiveram tamanho médio de partícula de 105,88 e 101,30  $\mu\text{m}$  para o tratamento com sobrecamada de 0,5 e 2,0%, respectivamente (Figuras 22 e 23).

Esses resultados, no entanto, não se assemelham aos de Nogueira (2013), que descreveu que houve aumento do tamanho nas partículas que foram recobertas, com tamanhos médios das entre 134,0 a 192,8  $\mu\text{m}$ .

Observa-se que os tratamentos que receberam a sobrecamada proteica obtiveram tamanhos inferiores ao tratamento que não recebeu, com uma diferença de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  (Figuras 21, 22 e 23). Segundo Mukai-Corrêa (2003), é característico que micropartículas produzidas somente com polissacarídeos formadores de géis apresentem maior diâmetro, devido à presença de grupos hidrofílicos, que aumentam a capacidade de retenção de água. Além disso, a capacidade de absorver água está atrelada a porosidade da matriz, quanto maior o número de poros, maior a afinidade pela água (MOURA; RUBIRA; MUNIZ, 2008).



55,13  $\mu\text{m}$  (ETCHEPARE, 2014; LISERRE; RÉ; FRANCO, 2007) até 432  $\mu\text{m}$  (BOSCARIOLI, 2010). Microcápsulas que receberam sobrecamada de proteína obtiveram tamanhos de partículas em torno de 500  $\mu\text{m}$  (LEE; HEO, 2000).

Conforme Lee e Heo (2000), quanto maior as partículas e quanto maior a concentração de alginato, maior será a viabilidade dos microrganismos probióticos encapsulados. Sheu, Marshall e Heymann (1993), obteve resultados semelhantes, ou seja, partículas com diâmetro grande proporcionaram maior proteção para *L. bulgaricus* em sobremesas congeladas. Em contrapartida, sabe-se que microcápsulas com diâmetro muito grande podem causar defeito na textura do alimento.

Concentrações de gel abaixo de 2% não formam microcápsulas esféricas (LEE; HEO, 2000), pois géis de baixa viscosidade são incapazes de manter sua forma esférica frente a forças mecânicas e podem não prover a proteção suficiente. Já, com alta concentração de alginato (5% ou mais) não se pode formar pequenas partículas devido a sua massa elevada. Desse modo, entende-se que a morfologia das microcápsulas e sua forma arredondada, além de outros fatores, também é dependente da concentração do gel (LEE; HEO, 2000).

A obtenção de microcápsulas com tamanho uniforme necessita que fatores como viscosidade da solução, altura do bico atomizador e pressão do ar sejam mantidos constantes durante todo o procedimento. Variações em qualquer um desses fatores podem resultar em microcápsulas de tamanhos bem heterogêneos (BAJPAI; TANKHIWALE, 2006).

#### **4.6 Rendimento e composição química do doce de leite *light* contendo *E. faecium* livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC**

Segundo Perrone et al. (2012), um pontos que deve ser controlado para um maior rendimento de fabricação do doce de leite é a qualidade da matéria prima. Quanto maior for o teor de sólidos totais no leite, maior será a quantidade de produto final obtido. Elevado teor de sólidos também impacta favoravelmente na diminuição do tempo de evaporação e desta forma na redução dos gastos com vapor. Os parâmetros analisados no leite utilizado como matéria prima estão expostos na Tabela 9.

O teor de lipídeos do doce de leite influencia diretamente o rendimento e é definido por meio da padronização da gordura do leite. Segundo Perrone (in CASTANHEIRA, 2012), o teor mínimo de gordura no leite para a fabricação de doce de leite tradicional é aproximadamente 2,6%.

Tabela 9 – Análise do leite desnatado utilizado na fabricação do doce de leite *light*

Leite desnatado	
Gordura total (%)	0,5
Densidade a 15 °C (g·mL)	1.031
Acidez (°Dornic)	16

No entanto, para elaboração do doce de leite *light*, foi necessário utilizar matéria prima com concentração de gordura de 0,5% (Tabela 9), reduzindo assim o rendimento (Tabela 10).

Tabela 10 – Rendimento doce de leite *light* contendo *E. faecium* livre e microencapsulado, com sobrecamada de concentrado proteico de soro de leite (WPC)

Tratamentos	C	T0,5%	T2%
Ingredientes (Kg)	8,167	8,167	8,167
Doce de Leite (Kg)	2,200	2,226	2,231
Rendimento (%)	26,93	27,25	27,31

C – Célula probiótica livre.

T0,5% – Microcápsula com sobrecamada de 0,5% de WPC.

T2% - Microcápsula com sobrecamada de 0,5% de WPC.

O rendimento do doce de leite *light* elaborado no presente estudo ficou em torno de 27%. Resultados semelhantes, 26 a 40%, foram encontrados por Guimarães et al. (2012a), onde os maiores rendimentos foram alcançados com as maiores concentrações de povidona e menor substituição de sacarose por sucralose. No doce de leite elaborado de forma tradicional, com açúcar e sem nenhum aditivo, o rendimento foi de 35,5%, enquanto que os doces que tiveram o açúcar substituído por edulcorantes e incorporado o espessante carragena, o rendimento foi de 29 e 23% (MILAGRES et al., 2010). Ferreira (2009) relata que os maiores rendimentos alcançados, ao redor de 47%, foram nos doces de leite elaborados com a maior concentração de soro de leite.

Outro fator que influencia no rendimento do doce de leite é o controle da umidade final. Quanto maior o teor final de umidade do doce de leite, maior quantidade de produto será obtida. Entretanto, deve – se ressaltar que a legislação estipula um máximo de umidade de 30% e que dependendo das características desejadas no produto final teores elevados de umidade não são desejados (PERRONE et al., 2012).

Os resultados da composição química dos doces elaborados neste estudo (Tabela 11) se assemelham a outros trabalhos que buscaram reduzir o valor calórico do doce de leite através de substituição dos ingredientes (GARCÍA; CARDONA, 2008; GUIMARÃES et al.,

2012a; MILAGRES et al., 2010; RANALLI; ANDRÉS; CALIFANO, 2012; SANTOS; GOULART; RAMOS, 2012).

Tabela 11 – Composição bromatológica do doce de leite *light* contendo *E. faecium* livre ou microencapsulado, com sobrecamada de concentrado proteico de soro de leite (WPC)

	C	T0,5%	T2%	P	DP
U(%)	32,35 <sup>B</sup>	38,88 <sup>A</sup>	38,52 <sup>A</sup>	<0,0001	0,141
L(%)	0,79 <sup>A</sup>	0,50 <sup>B</sup>	0,44 <sup>B</sup>	0,012	0,105
P(%)	9,97	10,0	9,74	0,942	0,989
Cz(%)	2,56	2,37	2,29	0,073	0,117
C.T(%)	54,33 <sup>A</sup>	48,25 <sup>B</sup>	49,01 <sup>B</sup>	0,0006	1,009
C.N.F(%)	46,22 <sup>A</sup>	40,24 <sup>B</sup>	41,01 <sup>B</sup>	0,0007	1,009
V.C(Kcal)	244 <sup>A</sup>	217,5 <sup>B</sup>	219 <sup>B</sup>	<0,0001	1,508

U – umidade, L- lipídeos, Cz – cinzas, C.T- carboidratos totais, CNF – carboidratos não fibrosos, F.A – Fibra alimentar, VC – valor calórico, C- doce de leite com a célula livre, sem a cápsula, T0,5% – cápsula com sobrecamada de WPC 0,5%, T2% – cápsula com sobrecamada de WPC 2,0%.

Letras diferentes na mesma linha significam que há diferença estatística significativa.

Os resultados da análise de umidade ficaram um pouco acima do limite máximo exigido por legislação (30%) para doce de leite tradicional (Tabela 11). Essa elevação da umidade pode ser atribuída à adição de 3% de inulina nos tratamentos. A inulina, por ser um ingrediente higroscópico, favorece a absorção de água e conseqüentemente eleva a umidade. Devido a essa propriedade, as formulações de doce de leite adicionadas de inulina (C, T0,5% e T2%) apresentaram valores de umidade superiores ao doce de leite tradicional (BRASIL, 1997). Segundo Santos, Goulart e Ramos (2012), o doce de leite sem inulina apresentou 25% de umidade, enquanto que o doce de leite com 3,0% de inulina apresentou 28,9% e o doce com 3,5% de inulina apresentou 30,2% de umidade. A concentração de 3,0% de inulina é a recomendada (SANTOS; GOULART; RAMOS, 2012) por atender ao padrão de umidade estipulado pela legislação (BRASIL, 1997). Desse mesmo modo, foi constatado que a maioria dos trabalhos que há substituição de ingredientes, com o intuito de reduzir o valor calórico, adição de fibras ou polissacarídeos, a umidade se eleva, ultrapassando 30% (KONKEL et al., 2004; RANALLI; ANDRÉS; CALIFANO, 2012). Uma alternativa para evitar o excesso de umidade no produto seria concentrar mais o doce de leite, aumentando a evaporação e o teor de sólidos do doce (>71°Brix), antes de adicionar a inulina.

Além da inulina, outro fator que contribuiu para aumentar a umidade do doce de leite *light* pode ter sido a adição das microcápsulas probióticas, as quais possuem 95% de umidade e atividade de água de 0,99 (ETCHEPARE, 2014; MUKAI-CORRÊA, 2003). Isso pode ser

observado na Tabela 11, onde o tratamento C (adição de célula livre) apresentou o menor valor de umidade, com diferença significativa em relação ao T0,5% (microcápsula probiótica com sobrecamada de 0,5% de WPC) e T2% (microcápsula probiótica com sobrecamada de 2% de WPC). Já entre os tratamentos T0,5% e T2% não houve diferença estatística. Uma alternativa para reduzir esses valores, adequando-os a legislação, seria adicionar microcápsulas liofilizadas no produto. Com a liofilização a atividade de água das microcápsulas reduz de 0,99 para 0,11, com a consequente redução da umidade (ETCHEPARE, 2014). Também pode-se observar que os doces do T0,5% e T2% apresentaram rendimento um pouco maior que o doce de leite do tratamento C, sugerindo que o doce do tratamento C teve maior evaporação, conseqüentemente maior perda de água e menor umidade e rendimento.

Baixos valores de sacarose no doce de leite levam, conseqüentemente, ao elevado teor de umidade e atividade de água. Sabe-se que a redução ou substituição da sacarose pode alterar a qualidade do produto, uma vez que o açúcar exerce importante papel na textura, doçura e até mesmo na vida útil do produto. García e Cardona (2008) estimaram que a vida útil do doce de leite *light* elaborado com sucralose é de apenas 10 dias.

As análises de lipídeos, carboidratos totais, carboidratos não fibrosos e valor calórico diferiram estatisticamente entre o tratamento C e os tratamentos T0,5% e T2% (Tabela 11), embora essa diferença ocorreu devido à umidade elevada do T0,5% e T2%, que conseqüentemente, fez com que os valores percentuais dos outros componentes reduzissem. Desse modo, pode-se afirmar que a adição das microcápsulas probióticas, além de sua finalidade principal de proteger o microrganismo, alterou a composição química do produto. Os tratamentos que receberam as microcápsulas (T0,5% e T2%) não apresentaram diferenças estatísticas entre si e obtiveram valores de carboidratos totais, carboidratos não fibrosos e conseqüentemente valor calórico ainda mais baixos que o tratamento adicionado de *E. faecium* livre.

O conteúdo de lipídeos esperado para doces de leite tradicionais, obtidos a partir de leite de vaca integral deve ser de 6,0 a 9,0% (BRASIL, 1997). O controle do teor de gordura do doce de leite é realizado por meio da padronização do teor de gordura da matéria prima. Estima-se que para a fabricação tradicional de doce de leite em pasta o teor mínimo de gordura no leite deve ser de aproximadamente 2,6% (PERRONE et al., 2012), enquanto que o leite utilizado nesse estudo apresentou apenas 0,5%. O resultado da análise de lipídeos demonstrou que o doce de leite *light* apresentou valores de gordura muito baixos. Para o tratamento C, o valor foi de 0,79%, e para os T0,5% e T2% foi de 0,50% e 0,44%,

respectivamente. Semelhantemente a este trabalho, Guimarães et al. (2012a) ao produzir doce de leite *light*, com substituição do leite integral por desnatado, encontrou teores lipídicos que variaram de 0,5% a 1%. Valores bem superiores, (6,3% e 6,1%) foram encontrados por Santos, Goulart e Ramos, (2012), em doces elaborados com mistura de leite integral e desnatado, adicionados de inulina. Análises feitas em diversas marcas comerciais de doce de leite (KONKEL et al., 2004) mostraram valores de lipídeos muito variáveis, desde a ausência até 8,4% de gordura no produto. Os autores sugerem a utilização de leite desnatado para reduzir a concentração de lipídeos e mantê-lo dentro dos padrões estabelecido pela legislação brasileira (GARCÍA; CARDONA, 2008; KONKEL et al., 2004; SANTOS; GOULART; RAMOS, 2012; ).

Quanto ao teor de cinzas, não houve diferença estatística dos teores de cinzas entre os tratamentos, porém, todos apresentaram valores um pouco acima do permitido por legislação (BRASIL, 1997). Resultados semelhantes foram descritos em outros estudos que utilizaram fontes de fibra na composição do doce (Guimarães et al., 2012a). Isso se explica porque as fibras possuem até 0,5% de cinzas em suas formulações comerciais (SANTOS; GOULART; RAMOS, 2012).

Para variável teor de proteína, que segundo a legislação (BRASIL, 1997) deverá ser no mínimo 5%, obtivemos resultados de 9,9%, 10% e 9,7% para o tratamento C, T0,5% e T2% respectivamente. Esses valores foram superiores aos encontrados por Santos, Goulart e Ramos (2012), que foi de 8,3 para o doce de leite com 3,0% de inulina e 8,5% para o doce sem inulina. Guimarães et al., (2012a) encontraram valores de proteína que variaram de 9 a 12%, utilizando diferentes concentrações de polidextrose, sucralose e sacarose.

Os teores de carboidratos totais encontrados nos tratamentos C, T0,5% e T2% foram 54,33%, 48,25% e 49,01%, respectivamente (Tabela 11), os quais se mostraram semelhantes aos resultados encontrados por Konkel et al., (2004) em doce de leite adicionado de diferentes concentrações de amido e aos resultados de Santos, Goulart e Ramos (2012) que encontraram 51% de carboidratos totais no doce de leite com adição de 3,0% de inulina.

A porcentagem de fibra alimentar presente no doce de leite *light* foi de 8% (Tabela 11), determinada através da quantidade de inulina adicionada na formulação do doce de leite *light*. De acordo com a legislação brasileira, alimentos sólidos devem conter no mínimo 3% de fibra alimentar para serem considerados fonte de fibra alimentar (BRASIL, 1998). Logo, o doce de leite *light* elaborado com 3% de inulina pode ser considerado um alimento com alta fonte de fibra alimentar. Esse resultado se mostrou bem superior ao



encontrado por Guimarães et al. (2012a), que com o uso de polidextrose obteve de 1,4% a 3,9% de fibra alimentar.

O valor calórico obtido na formulação do doce de leite *light* foi de 219 a 244 Kcal/100 g (Tabela 11). Sabendo-se que o valor energético de um doce de leite tradicional varia em torno de 300 Kcal/100 g (GUIMARÃES et al., 2012) obtivemos uma redução calórica de mais de 25%, como exigido por legislação para um alimento poder ser denominado de *light* (BRASIL, 2012). Guimarães et al. (2012a), elaboraram um doce de leite com 10% de sacarose, concentração essa utilizada no presente estudo, e encontraram valor energético entre 203 e 238 Kcal/100 g.

As principais vantagens apresentadas com o uso de inulina foram aumento de viscosidade, maior teor de fibra alimentar e valor calórico menor. Além disso, as fibras solúveis possuem ação prebiótica, com vários benefícios à saúde (MONTAN, 2003). Em comparação com o doce de leite tradicional, obtivemos valores nutricionais satisfatórios com as formulações elaboradas, com redução de cerca de 25% do valor calórico e aumento da fibra alimentar nos três tratamentos. Analisando a composição centesimal do produto elaborado, percebemos que a redução calórica, foi consequência da substituição da sacarose por sucralose e da redução da gordura.

Os valores de pH não diferiram estatisticamente (dados não mostrados), ficando ao redor de 6,5 ( $\pm 0,87$ ). De acordo com Antunes, Cazetto e Bolini (2005), o concentrado proteico do soro de leite (WPC) pode aumentar a capacidade de tamponamento de produtos lácteos, devido à proteína e conteúdo de fosfato. Como as microcápsulas dos tratamentos T0,5% e T2% receberam sobrecamada de WPC de 0,5% e 2%, respectivamente, este fato provavelmente contribuiu para a estabilidade dos valores de pH encontrados no presente estudo.

Coman et al., (2012) também não identificaram alterações significativas no pH dos produtos elaborados com adição de probióticos. Por outro lado, García e Cardona (2008) relataram que houve variação significativa de pH durante os dez dias de armazenamento de um doce de leite com baixo valor calórico, sem adição de probióticos.

As variações nas formulações devem atender às oscilações normais de composição da matéria prima, visando uniformizar a qualidade físico-química e microbiológica dos diferentes lotes (MARTINS; LOPES, 1981). Estudos demonstram que o doce de leite não possui uniformidade, apesar de ser produzido em grande volume e amplamente empregado como ingrediente alimentício (DEMIATE; KONKEL; PEDROSO, 2001).

As possíveis causas de deterioração do doce de leite, que podem reduzir sua vida útil devido à substituição de ingredientes incluem: mudanças na textura devido ao emprego de hidrocolóides, escurecimento do produto pelo uso de açúcares redutores e rápido desenvolvimento microbiano pelo aumento da atividade de água (GARCÍA; CARDONA, 2008).

#### **4.7 Viabilidade do probiótico *E. faecium* durante a vida de prateleira do doce de leite *light***

A sobrevivência do probiótico *E. faecium* durante a vida de prateleira do doce de leite *light*, está apresentada na Tabela 13. Observa-se que houve diferença significativa entre o tratamento C (célula livre) e os tratamentos T0,5% e T2% (microcápsulas com sobrecamada de WPC de 0,5% e 2%, respectivamente). No C não houve viabilidade do probiótico nem no dia 0, enquanto que no T0,5% e T2% podemos observar que o *E. faecium* permaneceu viável, em contagens consideradas eficazes para o efeito probiótico, acima de 8 a 9 Log UFC·100 g<sup>-1</sup> (BRASIL, 1999) ou 7 Log UFC·g<sup>-1</sup> (FAO, 2002) até o dia 90. Também pode-se dizer que a partir do dia 60 houve uma redução significativa da viabilidade dos microrganismos probióticos de ambos tratamentos, se comparados com os dias iniciais, conforme mostra a Tabela 12.

Para alimentos contendo probióticos, o produto final deve ter vida média de 15 a 30 dias, permanecendo com número de células viáveis maior que 6 Log UFC·mL<sup>-1</sup> (BRASIL, 1999; TRABULSI; SAMPAIO, 2000). Resultados semelhantes ao desse estudo foram encontrados por Coman et al., (2012) ao desenvolver novas matrizes alimentares probióticas. Os produtos lácteos, como *mousse* de chocolate, tiveram concentrações probióticas ao redor de 7 a 9 Log UFC·g<sup>-1</sup> até o final da vida de prateleira (30 dias).

De acordo com Vasconcelos (2010), não houve redução expressiva da contagem de probióticos em um *mix* de açaí durante o armazenamento a -18 °C e a viabilidade dos probióticos no dia 84 foi satisfatório, acima de 8 Log UFC·porção. A adição da inulina como prebiótico tampouco teve interferência na viabilidade bacteriana. Resultados divergentes foram encontrados por Buriti, Castro e Saad (2010), que relataram que a adição de inulina em *mousses* aumenta a viabilidade dos probióticos.

Tabela 12 – Viabilidade dos microrganismos probióticos livres ou microencapsulados, com sobrecamada de concentrado proteico de soro de leite (WPC), no doce de leite *light* armazenado por 90 dias a 4 °C

	C	T0,5% Log UFC·g <sup>-1</sup>	T2%	Média Tempo
D0	0 (±0,13) <sup>Ab</sup>	7,93(±0,13) <sup>Ba</sup>	7,64(±0,13) <sup>Ba</sup>	5,19(±0,08)
D15	0(±0,13) <sup>Ac</sup>	8,54(±0,13) <sup>Aa</sup>	8,11(±0,13) <sup>Ab</sup>	5,55(±0,08)
D30	0(±0,13) <sup>Ac</sup>	8,60(±0,13) <sup>Aa</sup>	8,11(±0,13) <sup>Ab</sup>	5,57(±0,08)
D45	0(±0,13) <sup>Ac</sup>	7,57(±0,13) <sup>BCb</sup>	8,0(±0,13) <sup>ABa</sup>	5,19(±0,08)
D60	0(±0,13) <sup>Ab</sup>	7,53(±0,13) <sup>Ca</sup>	7,32(±0,13) <sup>BCa</sup>	4,95(±0,08)
D75	0(±0,13) <sup>Ab</sup>	7,60(±0,13) <sup>BCa</sup>	7,23(±0,13) <sup>Ca</sup>	4,94(±0,08)
D90	0(±0,13) <sup>Ab</sup>	7,5(±0,13) <sup>Ca</sup>	7,23(±0,13) <sup>Ca</sup>	4,91(±0,08)
Média Trat.	0(±0,04)	7,90(±0,04)	7,66 (±0,04a)	

\* Erro padrão está apresentado entre parênteses, é normal ser igual quando rep. são iguais.

Letras maiúsculas comparação na coluna / minúscula nas linhas. Letras diferentes significa que houve diferença estatística significativa entre as variáveis analisadas.

Efeito de tratamento:  $p < 0,0001$ , Tempo  $p = < 0,0001$ , Tempo\*tratamento  $p = 0,0002$

C: célula livre, sem adição de microcápsula, T0,5%: microcápsula com sobrecamada de 0,5% de WPC, T2%: microcápsula com sobrecamada de 2,0% de WPC.

Silva et al. (2012), relata que a viabilidade do probiótico adicionado em *flan* de chocolate foi maior que 9 Log UFC·g<sup>-1</sup>, indicando que doces também podem ser um excelente meio para veicular probióticos. Corrêa, Castro e Saad (2008), avaliaram a viabilidade de microrganismos probióticos em manjar branco armazenado a 5°C, durante 28 dias. Similarmente ao nosso trabalho (Tabela 12), as contagens mantiveram-se acima de 7 Log UFC·g<sup>-1</sup> durante todo o período de armazenamento.

Em outro trabalho, que avaliou a viabilidade de *L. acidophilus* em *mousse* de maracujá e goiaba, relatou-se que a presença do maracujá inibiu o crescimento do probiótico. O mesmo efeito inibidor não foi observado no *mousse* de goiaba, no qual a viabilidade probiótica do *L. acidophilus* se manteve acima de 6 Log UFC·g<sup>-1</sup> do produto (BURITI; KOMATSU; SAAD, 2007).

Buriti, Castro e Saad (2010) estudaram o efeito da substituição da gordura do leite pela inulina e concentrado proteico do soro do leite na viabilidade de *L. acidophilus* La - 5 em *mousse* de goiaba. Os autores observaram que, após 14 dias de armazenamento sob refrigeração, a sobrevivência do microrganismo probiótico diminuiu consideravelmente e a suplementação com inulina e proteína de soro de leite não conferiram proteção para as bactérias probióticas.

Apesar de concluirmos que a microcápsula conferiu proteção aos probióticos, não houve relação estatística entre a porcentagem de proteína adicionada na microcápsula e a viabilidade bacteriana (Tabela 12). Pode-se observar que tanto T0,5% quanto T2% apresentaram resultados de viabilidade estatisticamente semelhantes no final da vida de prateleira do produto. Desse modo, pode-se concluir que a concentração de proteína de soro do leite da sobrecamada da microcápsula não interferiu na viabilidade do probiótico.

Outros estudos também relatam que probióticos microencapsulados que receberam sobrecamada tiveram maior viabilidade que as células livres (KAILASAPATHY, 2006). No entanto, diferentemente do relatado por Kailasapathy (2006) onde a adição de proteína como recobrimento da microcápsula de alginato parece melhorar significativamente a sobrevivência de bactérias probióticas encapsuladas tanto em condições gastrointestinais *in vitro* quanto no produto, nossos resultados não indicam que houve aumento na viabilidade devido ao aumento da concentração de proteína no recobrimento capsular.

A análise da viabilidade de probióticos em iogurte revelou que houve um decréscimo de 4 Log UFC·mL<sup>-1</sup> quando adicionadas células livres, comparadas com probióticos microencapsulados. E ainda os que receberam sobrecamada de quitosana tiveram somente decréscimo de 2 Log e 1 Log respectivamente (KAILASAPATHY, 2006).

É importante ressaltar que durante o processamento de alimentos probióticos várias etapas devem ser otimizadas com o objetivo de manter o maior número possível de células probióticas viáveis, para atingir o efeito terapêutico desejado no alimento. Para tanto, deve-se fazer a escolha correta da cepa probiótica e a concentração que será utilizada no alimento, o momento de inoculação dos probióticos, o controle dos procedimentos de fabricação, a temperatura de transporte e armazenamento, além das características intrínsecas do alimento, ingredientes utilizados e presença de prebióticos (COMAN et al., 2012).

#### **4.8 Análise microbiológica do doce de leite *light* contendo *E. faecium* livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC**

A contaminação de alimentos por bactérias patogênicas é um risco para a saúde pública. Os alimentos podem ser contaminados de diversas formas e em vários estágios, desde a obtenção da matéria prima, com práticas agrícolas incorretas, durante o processo tecnológico de produção, no armazenamento e até mesmo na casa do consumidor (JAY, 2005).

Para o sucesso tecnológico no processamento e garantia da segurança alimentar, o leite a ser utilizado na fabricação do doce de leite deve ter a sua qualidade microbiológica assegurada, o que muitas vezes não é levado em consideração pelos fabricantes (PERRONE et al., 2011).

A alta temperatura aliada ao longo tempo que é necessário para elaboração do doce de leite, considerando as boas práticas de fabricação no momento do envase, previne a ocorrência de microrganismos patogênicos e deteriorantes (SÁ et al., 2012).

Na literatura científica, há poucos trabalhos relacionados principalmente à caracterização microbiológica do doce de leite (SÁ et al., 2012). Mas sabe-se que apesar da baixa atividade de água e das altas concentrações de açúcares, a possibilidade de veiculação de bactérias patogênicas não pode ser descartada (TIMM et al., 2007).

De acordo com a Tabela 13, observa-se que todos os tratamentos possuíam contagem de *S. aureus* coagulase positiva no dia 0, provavelmente devido à manipulação do doce de leite no momento da adição das microcápsulas e do envase. No entanto, a contagem foi reduzindo significativamente durante o decorrer da vida de prateleira do produto. Sugere-se que essa redução tenha ocorrido devido às condições desfavoráveis do produto, baixa atividade de água e alta concentração de açúcares. O mesmo ocorreu com a análise de bolores e leveduras (Tabela 14), que apresentou uma contagem inicial, reduzindo a mesma durante o período de armazenamento. Pode-se observar também que no dia 60 (Tabela 14) houve um aumento inexplicável da contagem de bolores e leveduras, que foi atribuído a uma contaminação no momento da análise.

Timm et al., (2007) analisando 28 amostras de doce de leite fracionadas e vendidas nos supermercados, mostraram que todas as amostras apresentaram contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva abaixo de  $10^1$  UFC·g<sup>-1</sup>. Entretanto, somente uma amostra obteve contagens dentro dos padrões da legislação para bolores e leveduras, todas as outras estavam acima de  $10^2$  UFC·g<sup>-1</sup>. Em outro estudo *S. aureus* foi isolado de doce de leite experimentalmente contaminado somente até o terceiro dia de estocagem. Não foi possível a recuperação desta bactéria no quinto, décimo, vigésimo e trigésimo dia de armazenamento (HENTGES et al., 2010), corroborando com os resultados deste estudo.

Tabela 13 – Contagem de *S. aureus* coagulase positiva, expresso em Log UFC·g<sup>-1</sup>, durante a vida de prateleira do doce de leite *light* contendo *E. faecium* livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC, armazenado a 4 °C

	C	T0,5%	T2%	Média Tempo
D0	2,20(±0,06) <sup>Ab</sup>	4,75(±0,06) <sup>Aa</sup>	2,20(±0,06) <sup>Bb</sup>	4,13(±0,03)
D15	0(±0,06) <sup>Bc</sup>	4,41(±0,06) <sup>Bb</sup>	4,80(±0,06) <sup>Aa</sup>	3,07(±0,03)
D30	0(±0,06) <sup>Ba</sup>	0(±0,06) <sup>Ca</sup>	0(±0,06) <sup>Ca</sup>	0(±0,03)
D45	0(±0,06) <sup>Ba</sup>	0(±0,06) <sup>Ca</sup>	0(±0,06) <sup>Ca</sup>	0(±0,03)
D60	0(±0,06) <sup>Ba</sup>	0(±0,06) <sup>Ca</sup>	0(±0,06) <sup>Ca</sup>	0(±0,03)
D75	0(±0,06) <sup>Ba</sup>	0(±0,06) <sup>Ca</sup>	0(±0,06) <sup>Ca</sup>	0(±0,03)
D90	0(±0,06) <sup>Ba</sup>	0(±0,06) <sup>Ca</sup>	0(±0,06) <sup>Ca</sup>	0(±0,03)
Média Trat.	0,31(±0,02)	1,31(±0,02)	1,46(±0,02)	

\* Erro padrão está apresentado entre parênteses, é normal ser igual quando rep. são iguais.

Letras maiúsculas comparação na coluna / minúscula nas linhas. Letras diferentes significa que houve diferença estatística significativa entre as variáveis analisadas.

Efeito de tratamento:  $p < 0,0001$ , Efeito de tempo  $p = < 0,0001$ , Efeito de tempo\*tratamento:  $p = < 0,0001$ .

C: célula livre, sem adição de microcápsula, T0,5%: microcápsula com sobrecamada de 0,5% de WPC, T2%: microcápsula com sobrecamada de 2,0% de WPC.

Tabela 14 – Contagem de bolores e leveduras, expresso em Log UFC·g<sup>-1</sup>, durante a vida de prateleira do doce de leite *light* contendo *E. faecium* livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC, armazenado a 4 °C

	C	T0,5%	T2%	Média Tempo
D0	3,0(±0,06) <sup>Ba</sup>	3,0(±0,06) <sup>Ba</sup>	3,0(±0,06) <sup>Aa</sup>	3,0(±0,03)
D15	0(±0,06) <sup>Cb</sup>	0(±0,06) <sup>Cb</sup>	2,78(±0,06) <sup>Ba</sup>	0,93(±0,03)
D30	0(±0,06) <sup>Ca</sup>	0(±0,06) <sup>Ca</sup>	0(±0,06) <sup>Ca</sup>	0(±0,03)
D45	0(±0,06) <sup>Ca</sup>	0(±0,06) <sup>Ca</sup>	0(±0,06) <sup>Ca</sup>	0(±0,03)
D60	4,54(±0,06) <sup>Aa</sup>	3,70(±0,06) <sup>Ab</sup>	3,11(±0,06) <sup>Ac</sup>	3,78(±0,03)
D75	0(±0,06) <sup>Ca</sup>	0(±0,06) <sup>Ca</sup>	0(±0,06) <sup>Ca</sup>	0(±0,03) <sup>Ac</sup>
D90	0(±0,03) <sup>Ca</sup>	0(±0,03) <sup>Ca</sup>	0(±0,03) <sup>Ca</sup>	0(±0,03) <sup>Ac</sup>
Média Trat.	1,08(±0,02)	0,96(±0,02)	1,27(±0,02)	

\* Erro padrão está apresentado entre parênteses, é normal ser igual quando rep. são iguais.

Letras maiúsculas comparação na coluna / minúscula nas linhas. Letras diferentes significa que houve diferença estatística significativa entre as variáveis analisadas.

Efeito de tratamento:  $p = 0,0002$ , Efeito de tempo  $p = < 0,0001$ , Efeito de tempo\*tratamento:  $p = < 0,0001$ .

C: célula livre, sem adição de microcápsula, T0,5%: microcápsula com sobrecamada de 0,5% de WPC, T2%: microcápsula com sobrecamada de 2,0% de WPC.

Sabe-se que o doce de leite pode permitir o crescimento microbiano durante a estocagem. Na análise de oito marcas comerciais, foram recuperados microrganismos aeróbios mesófilos em 25% (2 amostras de 8 analisadas) das amostras e em 12,5% das

amostras (1 amostra de 8 analisadas) foi identificado bolores e leveduras e *Staphylococcus* coagulase negativa (SÁ et al., 2012). Oliveira et al. (2012) também encontrou altas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos (83,3%, 5 amostras de 6 analisadas) e bolores e leveduras (50%, 3 amostras de 6 analisadas) em amostras de doce de leite. A contagem de bolores e leveduras variou de 5 a 6 Log UFC·g<sup>-1</sup> e a de microrganismos aeróbios mesófilos foi de 5 Log UFC·g<sup>-1</sup>.

As bactérias mesófilas multiplicam-se rapidamente em temperatura ambiente, o que causa acidez do produto. Ainda que não haja patógenos, um número elevado de microrganismos mesófilos indica que o alimento é insalubre (com exceção aos alimentos probióticos) e que houve condição para patógenos se multiplicarem, já que a maioria das bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas (LANDGRAF, 2008).

Bolores e leveduras são os principais deteriorantes do doce de leite, justamente por possuírem maior resistência à baixa atividade de água e ao estresse térmico. O desenvolvimento desses microrganismos depende da formulação e características físico-químicas do produto. Fatores ambientais como temperatura de armazenamento do produto e boas práticas de fabricação também são importantes para evitar ou reduzir as perdas por deterioração (CHAR et al., 2005). Os bolores e as leveduras são importantes indicadores das condições higiênicas do ambiente de produção de alimentos e da qualidade da matéria prima. Além disso, podem estar associados à produção de metabólitos tóxicos (micotoxinas) e deterioração de alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Coman et al.(2012), observou que no *mousse* de chocolate elaborado com adição de probióticos não houve contagem de fungos e leveduras durante a vida útil do produto, enquanto que no produto tradicional, sem a adição dos microrganismos, foram detectadas quantidades significativas desses contaminantes.

Não foi observado a presença de coliformes totais e coliformes termotolerantes, em nenhum tratamento do doce de leite *light* (dados não apresentados). No entanto sabe-se que *E. coli* O157:H7 é associada ao consumo de leite cru e produtos lácteos contaminados. Agente etiológico da síndrome urêmica-hemolítica, essa bactéria já foi isolada de doce de leite contaminado experimentalmente até o décimo dia de estocagem, mas não foi mais encontrada no vigésimo e no trigésimo dia de armazenamento (HUSSEIN; SAKUMA, 2005). A presença de enterobactérias foi observada em duas de seis amostras de doce de leite analisadas por Oliveira et al. (2012), e os valores variaram de  $3,7 \times 10^2$  a  $5,4 \times 10^3$  UFC·g<sup>-1</sup>. Esses resultados demonstram que esse patógeno tem habilidade limitada de sobrevivência no ambiente

fornecido pelo doce de leite (HENTGES et al., 2010). Por esse motivo talvez esses patógenos não foram encontrados nesse estudo.

Foi demonstrado que a contagem de Enterobactérias reduziu durante o período de armazenamento de produtos cárneos devido à inclusão de cepas probióticas. Por esse motivo, Pérez-Chabela et al., (2009) concluíram que as bactérias ácido lácticas adicionadas no produto atuaram como cultura bioprotetora. Há estudos, assim como esse que demonstram que a adição de *E. faecium* como probiótico inibiu o crescimento de bactérias patogênicas e deterioradoras presentes nos alimentos (HOSSEINI et al., 2009; PÉREZ-CHABELA et al., 2009). Logo, sugere-se que o doce de leite *light* elaborado nesse estudo tenha causado certa inibição às bactérias analisadas, pois observou-se uma redução significativa destas bactérias.

A adição de probióticos em alimentos pode ser uma alternativa ao uso de conservantes, uma vez que melhora a aceitação de alimentos pelos consumidores e tem efeitos desejáveis como redução de outros microrganismos e aumento da vida de prateleira (COMAN et al., 2012).

#### **4.9 Perfil de textura do doce de leite *light* contendo *E. faecium* livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC**

Para o perfil dureza (Tabela 15), houve diferença estatística significativa entre o tratamento C (célula livre de *E. faecium*) que apresentou valor médio de 5,87 e os tratamentos T0,5% e T2% (com adição da microcápsula probiótica), com valores de 2,76 e 2,81 respectivamente, os quais não diferiram estatisticamente ( $P < 0,05$ ). Os valores de dureza dos T0,5% e T2% foram menores que o C provavelmente devido a maior umidade encontrada nesses tratamentos, pela adição da microcápsula não liofilizada. Apesar de encontrarmos resultados divergentes descritos na literatura (FERREIRA et al., 2011; GARCÍA; CARDONA, 2008; GUIMARÃES et al., 2012a). Ferreira et al. (2011) relataram que doces de leite que apresentaram menor umidade e atividade de água foram os que obtiveram os maiores valores para dureza e gomosidade (FERREIRA et al., 2011), o que também foi observado nesse estudo.

A dureza pode variar durante a vida de prateleira do produto devido às alterações de pH, o que promove a distribuição heterogênea das cargas elétricas das proteínas e aumenta a interação entre elas (GARCÍA; CARDONA, 2008). Nossos resultados demonstram essa variação. Ao observarmos a Tabela 15 percebemos que houve diferença significativa entre os 30 primeiros dias e o restante dos dias de armazenamento do doce de leite *light*.



Tabela 15 – Perfil de textura para o parâmetro dureza do doce de leite *light* contendo *E. faecium* livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC durante os 90 dias de armazenamento, a 4 °C

	C	T0,5%	T2%	Média Tempo
D0	5,44(±0,68)	1,13(±0,68)	1,06(±0,68)	2,54(±0,39) <sup>B</sup>
D15	3,31(±0,68)	2,37(±0,68)	2,21(±0,68)	2,63(±0,39) <sup>B</sup>
D30	4,70(±0,68)	2,46(±0,68)	2,41(±0,68)	3,19(±0,39) <sup>B</sup>
D45	5,85(±0,68)	3,52(±0,68)	3,57(±0,68)	4,31(±0,39) <sup>A</sup>
D60	7,43(±0,68)	3,27(±0,68)	3,36(±0,68)	4,68(±0,39) <sup>A</sup>
D75	7,19(±0,68)	3,20(±0,68)	3,48(±0,68)	4,62(±0,39) <sup>A</sup>
D90	7,14(±0,68)	3,40(±0,68)	3,59(±0,68)	4,71(±0,39) <sup>A</sup>
Média Trat.	5,87(±0,37) <sup>a</sup>	2,76(±0,37) <sup>b</sup>	2,81(±0,37) <sup>b</sup>	

\* Erro padrão está apresentado entre parênteses, é normal ser igual quando rep. são iguais.

Letras maiúsculas comparação na coluna / minúscula nas linhas. Letras diferentes significa que houve diferença estatística significativa entre as variáveis analisadas.

Efeito de tratamento:  $p=0,0015$ , Efeito de tempo  $p = <0,0001$ , Efeito de tempo\*tratamento:  $p = 0,2461$ .

C: célula livre, sem adição de microcápsula, T0,5%: microcápsula com sobrecamada de 0,5% de WPC, T2%: microcápsula com sobrecamada de 2,0% de WPC.

Para o parâmetro coesividade (Tabela 16), somente houve diferença estatística do tratamento C para os tratamentos T0,5% e T2% no dia 0. Nos demais dias, até o final do período de armazenamento (90 dias), não foi observado diferença significativa ( $P<0,05$ ) entre os tratamentos.

Tabela 16 – Perfil de textura para o parâmetro coesividade do doce de leite *light* contendo *E. faecium* livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC durante os 90 dias de armazenamento, a 4 °C

	C	T0,5%	T2%	Média Tempo
D0	1,80(±0,13) <sup>Aa</sup>	0,79(±0,13) <sup>Ab</sup>	0,80(±0,13) <sup>Ab</sup>	1,13(±0,08)
D15	0,83(±0,13) <sup>Ba</sup>	0,75(±0,13) <sup>Aa</sup>	0,73(±0,13) <sup>Aa</sup>	0,77(±0,08)
D30	0,70(±0,13) <sup>Ba</sup>	0,70(±0,13) <sup>Aa</sup>	0,76(±0,13) <sup>Aa</sup>	0,72(±0,08)
D45	0,76(±0,13) <sup>Ba</sup>	0,62(±0,13) <sup>Aa</sup>	0,69(±0,13) <sup>Aa</sup>	0,69(±0,08)
D60	0,71(±0,13) <sup>Ba</sup>	0,66(±0,13) <sup>Aa</sup>	0,71(±0,13) <sup>Aa</sup>	0,69(±0,08)
D75	0,61(±0,13) <sup>Ba</sup>	0,64(±0,13) <sup>Aa</sup>	0,71(±0,13) <sup>Aa</sup>	0,65(±0,08)
D90	0,58(±0,13) <sup>Ba</sup>	0,67(±0,13) <sup>Aa</sup>	0,77(±0,13) <sup>Aa</sup>	0,67(±0,08)
Média Trat.	0,86(±0,06)	0,69(±0,06)	0,74(±0,06)	

\* Erro padrão está apresentado entre parênteses, é normal ser igual quando as repetições são iguais.

Letras maiúsculas comparação na coluna / minúscula nas linhas. Letras diferentes significa que houve diferença estatística significativa entre as variáveis analisadas.

Efeito de tratamento:  $p=0,1915$ , Efeito de tempo:  $p = 0,0007$ , Tempo\*tratamento:  $p = 0,0042$ .

C: célula livre, sem adição de microcápsula, T0,5%: microcápsula com sobrecamada de 0,5% de WPC, T2%: microcápsula com sobrecamada de 2,0% de WPC.

Na análise da flexibilidade (Tabela 17), a qual mede a velocidade que um material deformado volta ao normal depois de retirada a força deformadora, observa-se que houve diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos no dia 0 e aos 30 dias, mas a partir do dia 45 todos os tratamentos apresentaram-se estatisticamente iguais. Ferreira et al. (2011) também não encontrou diferenças significativas entre as oito marcas analisadas para os parâmetros coesividade e flexibilidade. Também não foram encontradas diferenças significativas entre os doces de leite elaborados com substituição de leite por soro e adição de café para as variáveis dureza, adesividade, elasticidade, coesividade e gomosidade (FERREIRA, 2009). No entanto os resultados encontrados no presente estudo foram bem superiores (média de 14,76 para o tratamento C, 14,74 para o T0,5% e 14,05 para o T2%) aos descritos na literatura. Ferreira et al. (2011) encontrou valores de flexibilidade em torno de 0,87 a 0,89 e García e Cardona (2008) entre 0,89 a 0,94. Acredita-se que essa diferença seja consequência da adição de inulina e das microcápsulas probióticas de alginato de sódio com sobrecamada de WPC.

Tabela 17 – Perfil de textura para o parâmetro flexibilidade do doce de leite *light* contendo *E. faecium* livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC durante os 90 dias de armazenamento, a 4 °C

	C	T0,5%	T2%	Média Tempo
D0	18,28(±0,76) <sup>Aa</sup>	13,92(±0,76) <sup>Ab</sup>	13,10(±0,76) <sup>Ab</sup>	15,10(±0,43)
D15	13,67(±0,76) <sup>BCa</sup>	14,31(±0,76) <sup>Aa</sup>	14,71(±0,76) <sup>Aa</sup>	14,23(±0,43)
D30	11,96(±0,76) <sup>Cb</sup>	14,42(±0,76) <sup>Aa</sup>	11,89(±0,76) <sup>Ab</sup>	12,76(±0,43)
D45	15,05(±0,76) <sup>BCa</sup>	14,87(±0,76) <sup>Aa</sup>	15,09(±0,76) <sup>Aa</sup>	15,01(±0,43)
D60	15,40(±0,76) <sup>Ba</sup>	15,36(±0,76) <sup>Aa</sup>	14,23(±0,76) <sup>Aa</sup>	14,10(±0,43)
D75	15,26(±0,76) <sup>Ba</sup>	15,03(±0,76) <sup>Aa</sup>	14,43(±0,76) <sup>Aa</sup>	14,90(±0,43)
D90	13,72(±0,76) <sup>BCa</sup>	15,25(±0,76) <sup>Aa</sup>	14,87(±0,76) <sup>Aa</sup>	14,62(±0,43)
Média Trat.	14,76(±0,43)	14,74(±0,43)	14,05(±0,43)	

\* Erro padrão está apresentado entre parênteses, é normal ser igual quando as repetições são iguais.

Letras maiúsculas comparação na coluna / minúscula nas linhas. Letras diferentes significa que houve diferença estatística significativa entre as variáveis analisadas.

Efeito de tratamento:  $p=0,4580$ , Efeito de tempo:  $p = 0,0016$ , Efeito de tempo\*tratamento:  $p = 0,0011$ .

C: célula livre, sem adição de microcápsula, T0,5%: microcápsula com sobrecamada de 0,5% de WPC, T2%: microcápsula com sobrecamada de 2,0% de WPC.

Já para o parâmetro adesividade (Tabela 18), observamos que até o D15 os tratamentos não diferiram estatisticamente, mas a partir do D30 o tratamento C diferiu dos demais tratamentos (T0,5% e T2%). Também observamos uma diferença significativa na adesividade dentro do mesmo tratamento no decorrer do tempo. O valor de adesividade no D0, para todos os tratamentos foi significativamente menor que nos dias 60, 75 e 90, os quais

foram semelhantes entre si. Provavelmente isso deve ter ocorrido em função da diminuição da atividade de água, o que configura um ambiente químico no qual as moléculas de água realizam interações químicas de maior magnitude e/ou apresentam-se com maior número de configurações. Este fato associado à presença da inulina podem ser os principais causadores do comportamento de textura observado, já que isso ocorre devido a sinérese decorrente do emprego dos hidrocolóides e do aumento da viscosidade (FERREIRA et al., 2012). O aumento da adesividade no decorrer do tempo também foi evidenciado em outros trabalhos que elaboraram doce de leite *light*, com substituição de ingredientes e adição de polissacarídeos espessantes (FERREIRA et al., 2011; GARCÍA; CARDONA, 2008).

Tabela 18 – Perfil de textura para o parâmetro adesividade do doce de leite *light* contendo *E. faecium* livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC, durante os 90 dias de armazenamento a 4 °C

	C	T0,5%	T2%	Média Tempo
D0	-3,54(±2,50) <sup>Da</sup>	-4,70(±2,50) <sup>Da</sup>	-3,58(±2,50) <sup>Da</sup>	-3,94(±1,44)
D15	-16,03(±2,50) <sup>Ca</sup>	-11,34(±2,50) <sup>ABa</sup>	-11,44(±2,50) <sup>BCa</sup>	-12,94(±1,44)
D30	-21,90(±2,50) <sup>BCa</sup>	-10,42(±2,50) <sup>BCb</sup>	-9,90(±2,50) <sup>Cb</sup>	-14,07(±1,44)
D45	-27,62(±2,50) <sup>ABa</sup>	-14,64(±2,50) <sup>ABb</sup>	-17,78(±2,50) <sup>Ab</sup>	-20,01(±1,44)
D60	-33,47(±2,50) <sup>Aa</sup>	-16,17(±2,50) <sup>ABb</sup>	-16,22(±2,50) <sup>ABb</sup>	-21,95(±1,44)
D75	-28,0(±2,50) <sup>Aa</sup>	-15,95(±2,50) <sup>ABb</sup>	-16,93(±2,50) <sup>ABb</sup>	-20,29(±1,44)
D90	-32,65(±2,50) <sup>Aa</sup>	-17,05(±2,50) <sup>Ab</sup>	-17,50(±2,50) <sup>ABb</sup>	-22,40(±1,44)
Média Trat.	-23,32(±1,51)	-12,90(±1,51)	-13,33(±1,51)	

\* Erro padrão está apresentado entre parênteses, é normal ser igual quando as repetições são iguais.

Letras maiúsculas comparação na coluna / minúscula nas linhas. Letras diferentes significa que houve diferença estatística significativa entre as variáveis analisadas.

Efeito de tratamento:  $p=0,0045$ , Efeito de tempo:  $p = <0,0001$ , Efeito de tempo\*tratamento:  $p = 0,0070$ .

C: célula livre, sem adição de microcápsula, T0,5%: microcápsula com sobrecamada de 0,5% de WPC, T2%: microcápsula com sobrecamada de 2,0% de WPC.

Quanto a gomosidade (Tabela 19), observa-se que houve diferença significativa entre o tratamento C e os tratamentos T0,5% e T2%, em todos os dias analisados. Os tratamentos T0,5% e T2% não diferiram estatisticamente durante todo o período de armazenamento.

Tabela 19 – Perfil de textura para o parâmetro gomosidade do doce de leite *light* contendo *E. faecium* livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC, durante os 90 dias de armazenamento a 4 °C

	C	T0,5%	T2%	Média Tempo
D0	1,90(±0,30) <sup>Da</sup>	0,90(±0,30) <sup>Bb</sup>	0,85(±0,30) <sup>Cb</sup>	1,21(±0,17)
D15	2,77(±0,30) <sup>Ca</sup>	1,78(±0,30) <sup>Ab</sup>	1,62(±0,30) <sup>BCb</sup>	2,06(±0,17)
D30	3,29(±0,30) <sup>Ca</sup>	1,74(±0,30) <sup>Ab</sup>	1,84(±0,30) <sup>ABb</sup>	2,29(±0,17)
D45	4,46(±0,30) <sup>Ba</sup>	2,20(±0,30) <sup>Ab</sup>	2,49(±0,30) <sup>Ab</sup>	3,05(±0,17)
D60	5,25(±0,30) <sup>ABa</sup>	2,20(±0,30) <sup>Ab</sup>	2,42(±0,30) <sup>ABb</sup>	3,29(±0,17)
D75	4,46(±0,30) <sup>Ba</sup>	2,06(±0,30) <sup>Ab</sup>	2,45(±0,30) <sup>Ab</sup>	2,99(±0,17)
D90	5,35(±0,30) <sup>Aa</sup>	2,50(±0,30) <sup>Ab</sup>	2,62(±0,30) <sup>Ab</sup>	3,49(±0,17)
Média Trat.	3,92(±0,13)	1,91(±0,13)	2,04(±0,13)	

\* Erro padrão está apresentado entre parênteses, é normal ser igual quando as repetições são iguais.

Letras maiúsculas comparação na coluna / minúscula nas linhas. Letras diferentes significa que houve diferença estatística significativa entre as variáveis analisadas.

Efeito de tratamento:  $p = <0,0001$ , Efeito de tempo:  $p = <0,0001$ , Tempo\*tratamento:  $p = 0,0164$ .

C: célula livre, sem adição de microcápsula, T0,5%: microcápsula com sobrecamada de 0,5% de WPC, T2%: microcápsula com sobrecamada de 2,0% de WPC.

Ferreira et al., (2011) observou que há grande variação na textura dos doces de leite comerciais, e os consumidores preferem doces com textura menos gomosas e menos duras. O perfil de textura encontrado nesse trabalho para o doce de leite *light* diferiu bastante de outros trabalhos encontrados na literatura (FERREIRA et al., 2012; GARCÍA; CARDONA, 2008; GUIMARÃES et al., 2012a). Atribuímos essa divergência ao fato de o produto elaborado ser diferenciado dos demais doces de leite e possuir características próprias devido à substituição parcial da sacarose por sucralose, redução da gordura, adição de 3% de inulina e adição de microcápsulas probióticas de alginato de sódio com sobrecamada de WPC.

#### 4.10 Perfil de cor do doce de leite *light* contendo *E. faecium* livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC

Segundo Ferreira, Hough, Yotsuyanagi (1989) os parâmetros mais importantes para a avaliação da cor de doce de leite são a luminosidade ( $L^*$ ) e o teor amarelo ( $b^*$ ). O componente  $b^*$  varia de amarelo (+) a azul (-). Como todos os valores de  $b^*$  foram positivos, isso significa que os doces de leite *light* elaborados só apresentaram reflexão de comprimento de onda associado à cor amarela. O valor  $L^*$  expressa a luminosidade ou claridade da amostra, quanto mais próximo de 100 for o valor, mais clara é a amostra (FERREIRA et al., 2012; FERREIRA; HOUGH; YOTSUYANAGI, 1989).

Analisando os valores de  $L^*$  obtidos (Tabela 20), pode-se afirmar que os todos os tratamentos dos doces de leite *light* apresentaram as médias dos dias com luminosidade intermediária, variando de 57,22 a 61,12 durante todo o período de armazenamento, não apresentando interação estatística significativa entre tempo e tratamento ( $P=0,29$ ). Somente houve diferença significativa ( $p<0,05$ ) na variável tempo, entre o dia 0 com os demais dias. Os resultados encontrados se assemelham muito aos descritos por Ferreira et al. (2012) que relataram valores entre 53,1 a 59,6.

Tabela 20 – Perfil de luminosidade ( $L^*$ ) do doce de leite *light* contendo *E. faecium* livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC, durante 90 dias de armazenamento a 4 °C

	C	T0,5%	T2%	Média Tempo
D0	57,61( $\pm 0,93$ )	57,38( $\pm 0,93$ )	56,67( $\pm 0,93$ )	57,22( $\pm 0,54$ ) <sup>B</sup>
D15	61,22( $\pm 0,93$ )	57,53( $\pm 0,93$ )	58,61( $\pm 0,93$ )	59,12( $\pm 0,54$ ) <sup>A</sup>
D30	60,53( $\pm 0,93$ )	60,56( $\pm 0,93$ )	58,35( $\pm 0,93$ )	59,81( $\pm 0,54$ ) <sup>A</sup>
D45	58,85( $\pm 0,93$ )	59,64( $\pm 0,93$ )	59,62( $\pm 0,93$ )	59,37( $\pm 0,54$ ) <sup>A</sup>
D60	60,13( $\pm 0,93$ )	58,74( $\pm 0,93$ )	59,27( $\pm 0,93$ )	59,38( $\pm 0,54$ ) <sup>A</sup>
D75	61,68( $\pm 0,93$ )	62,45( $\pm 0,93$ )	59,24( $\pm 0,93$ )	61,12( $\pm 0,54$ ) <sup>A</sup>
D90	60,35( $\pm 0,93$ )	60,43( $\pm 0,93$ )	59,05( $\pm 0,93$ )	59,94( $\pm 0,54$ ) <sup>A</sup>
Média Trat.	60,22( $\pm 0,39$ )	59,53( $\pm 0,39$ )	58,69( $\pm 0,39$ )	

\* Erro padrão está apresentado entre parênteses, é normal ser igual quando as repetições são iguais. Letras diferentes significa que houve diferença estatística significativa entre as variáveis analisadas. Efeito de tratamento:  $p=0,1142$ , Efeito de tempo:  $p=0,0009$ , Efeito de tempo\*tratamento:  $p=0,2939$ . C: célula livre, sem adição de microcápsula, T0,5%: microcápsula com sobrecamada de 0,5% de WPC, T2%: microcápsula com sobrecamada de 2,0% de WPC.

Na Tabela 21, a intensidade de amarelo ( $b^*$ ) apresentou diferenças estatísticas somente na variável tratamento e na variável tempo, não apresentando interação entre as variáveis tratamento e tempo ( $P=0,6238$ ). O tratamento C apresentou valor médio para  $b^*$  de 34,80, que foi significativamente maior que os valores de T0,5% e T2%, que foram de 33,33 e 33,51 respectivamente. Durante a vida de prateleira os valores médios de  $b^*$  obtidos variaram entre 32,35 e 35,61. Houve um aumento significativo nos valores de  $b^*$  nos dias finais (60, 75 e 90) do armazenamento do doce de leite *light* se comparado com os dias iniciais (0, 15, 30 e 45), conforme Tabela 21. Contrariamente aos nossos resultados, García e Cardona (2008) não relataram alterações significativas de cor durante o armazenamento de doce de leite com baixo valor calórico.

Os resultados encontrados para a intensidade de amarelo foram satisfatórios, para um doce de leite *light* elaborado com somente 10% de sacarose (Figura 24), pois o doce

apresentou uma coloração intermediária, assemelhando-se aos doces de leite tradicionais. Estudos demonstram que os consumidores têm preferência por amostras mais escuras (FERREIRA et al., 2012). A aceitação mais baixa para os doces sem açúcar pode ser explicada pela cor mais clara e menor dureza desses. A ausência de sacarose diminui a reação de caramelização, responsável pelo sabor, aroma e cor dos doces de leite, que também pode justificar a menor aceitação dos doces de leite sem açúcar (MILAGRES et al., 2010).

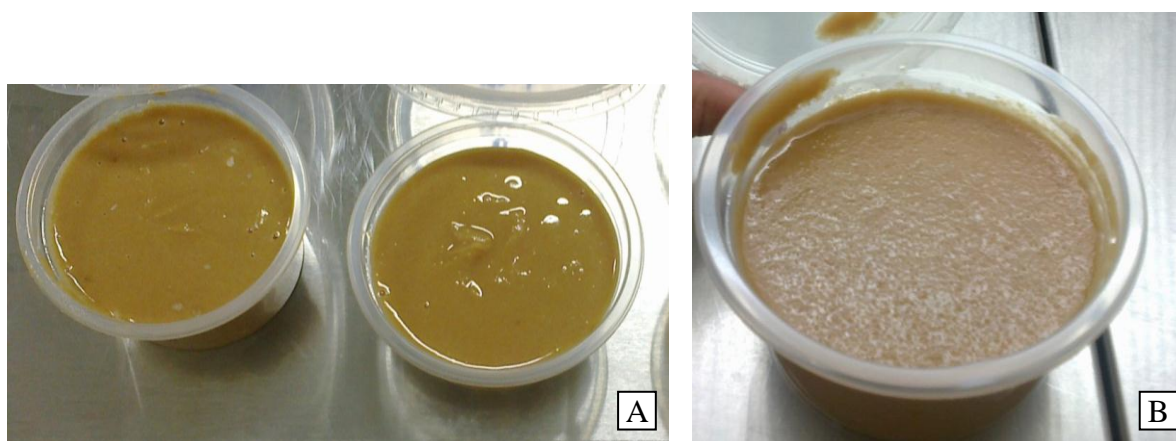


Figura 24 – Coloração do doce de leite *light* com adição de sucralose, inulina e microcápsulas probióticas no dia da fabricação (figura A) e no 60º dia de estocagem a 4°C (figura B).

Fonte: Autor (2015).

A literatura traz resultados bem diversificados para o parâmetro de intensidade de amarelo. Ferreira et al., (2012) encontrou resultados entre 17,28 e 28,08, valores menores dos observados nesse estudo. Já Pauletti et al., (1992) observou valores de 25,44 a 36,23, que corroboram com os encontrados nesse trabalho. A grande variação encontrada em diversos trabalhos se dá ao fato de não existir um padrão definido para a cor do doce e essa característica é muito regionalizada (FERREIRA et al., 2012).

Vários fatores durante o processo de fabricação também podem interferir na cor do doce de leite, como a adição de bicarbonato de sódio e de açúcares redutores como a glicose, que deixam o doce mais escuro, pois aceleram a reação de Maillard (FERREIRA; HOUGH; YOTSUYANAGI, 1989) a quantidade de sólidos totais, a umidade e o tempo de cozimento (FERREIRA et al., 2012).

Tabela 21 – Perfil de intensidade de amarelo ( $b^*$ ) do doce de leite *light* contendo *E. faecium* livre ou microencapsulado com sobrecamada de WPC, durante 90 dias de armazenamento a 4 °C

	C	T0,5%	T2%	Média Tempo
D0	33,72(±1,10)	32,61(±1,10)	30,73(±1,10)	32,35(±0,63) <sup>B</sup>
D15	34,91(±1,10)	33,10(±1,10)	33,11(±1,10)	33,70(±0,63) <sup>B</sup>
D30	34,73(±1,10)	30,18(±1,10)	33,46(±1,10)	32,79(±0,63) <sup>B</sup>
D45	33,74(±1,10)	33,73(±1,10)	33,93(±1,10)	33,80(±0,63) <sup>B</sup>
D60	34,99(±1,10)	33,77(±1,10)	34,85(±1,10)	34,54(±0,63) <sup>A</sup>
D75	36,69(±1,10)	35,83(±1,10)	34,31(±1,10)	35,61(±0,63) <sup>A</sup>
D90	34,79(±1,10)	34,11(±1,10)	34,21(±1,10)	34,37(±0,63) <sup>A</sup>
Média Trat.	34,80(±0,30) <sup>a</sup>	33,33(±0,30) <sup>b</sup>	33,51(±0,30) <sup>b</sup>	

\* Erro padrão está apresentado entre parênteses, é normal ser igual quando as repetições são iguais.

Letras maiúsculas comparação na coluna / minúscula nas linhas. Letras diferentes significa que houve diferença estatística significativa entre as variáveis analisadas.

Efeito de tratamento:  $p=0,0253$ , Efeito tempo:  $p = 0,0258$ , Efeito tempo\*tratamento:  $p = 0,6238$ .

C: célula livre, sem adição de microcápsula, T0,5%: microcápsula com sobrecamada de 0,5% de WPC, T2%: microcápsula com sobrecamada de 2,0% de WPC.





## 5 CONCLUSÕES

- A microencapsulação de probióticos em matriz de alginato, através da técnica de gelificação iônica com bico extrusor forma microcápsulas esféricas, uniformes, com conteúdo disperso na matriz e tamanho ideal para aplicação em matrizes alimentares;
- a adição da sobrecamada de concentrado proteico de soro de leite (WPC) aumentou a adsorção proteica na microcápsula, no entanto a quantidade de WPC adsorvida não influenciou na viabilidade do probiótico nos testes *in vitro* e tampouco no doce de leite *light*;
- microcápsulas de alginato com sobrecamada de WPC conferem proteção ao probiótico quando adicionadas no doce de leite *light*, porém alteram as características físico-químicas além da textura e da cor;
- foi possível elaborar microcápsulas de alginato por gelificação iônica com sobrecamada de WPC com alta adsorção proteica, capazes de serem resistentes a altas temperaturas, às condições adversas do meio e às condições gástricas *in vitro*;
- a viabilidade do probiótico *E. faecium* no teste de resistência gástrica *in vitro* foi alta, tanto como célula livre como microencapsulado;
- foi possível elaborar um doce de leite *light* com redução de mais de 25% de calorias através da redução de lipídeos da matéria prima, substituição da sacarose por sucralose e utilização de inulina;
- foi possível obter um doce de leite *light* com características funcionais e com viabilidade de  $7 \text{ Log UFC} \cdot \text{g}^{-1}$  de células probióticas no final dos 90 dias de armazenamento.

### 5.1 Sugestões

- Mais estudos devem ser desenvolvidos para entender o mecanismo de liberação de cápsulas de alginato obtidas por gelificação iônica com sobrecamada de WPC;
- Microcápsulas probióticas liofilizadas e alteração do processo de fabricação, com aumento da concentração de sólidos (°Brix) do doce de leite antes da adição da inulina, poderiam ser alternativas para atingir os padrões físico-químicos exigidos na legislação brasileira.

- Avaliar a aceitação do produto elaborado através de análise sensorial;
- Utilizar leite zero lactose para elaboração do doce de leite *light* contendo probióticos microencapsulados, pois além de saudável e funcional, seria uma alternativa para consumidores intolerantes a lactose, além de eliminar o problema de arenosidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, R. Probiotics: an emerging food supplement with health benefits. **Food Biotechnology**, v. 19, p. 227-46, 2005.
- AIMUTIS, W. L. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. **J Nutr**. v. 134, n. 4, p. 989-995, 2004.
- AKIN, M. B.; AKIN, M. S.; KIRMACI, Z. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. **Food Chem**, v. 104, p. 93-99, 2007.
- AKIN, M. S. **Effects of inulin and different sugar levels on viability of probiotic bacteria and the physical and sensorial characteristics of probiotic fermented ice-cream**. Harran University Agricultural Faculty Department of Food Engineering, v. 90, p. 297-301, 2005.
- ALLAN-WOJTAS, P.; FORNEY, C. F.; MOYLS, L.; MOREAU, D. L. Structure and gas transmission characteristics of microperforations in plastic films. **Packaging Technology and Science**, v. 21, p. 217-229, 2008.
- ALMEIDA, M. H. B.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; MOURA, M. R. L.; CARVALHO, L. M. J.; FREITAS, M. C. J. Effect of the acai pulp on the sensorial attributes of probiotic yoghurts. **International Journal of Probiotics & Prebiotics**, v. 4, p. 41-44, 2009.
- ALMEIDA, M. H. B.; ZOELLNER, S. S.; CRUZ, A. G.; MOURA, M. R. L.; CARVALHO, L. M. J.; SANTANA, A. S. Potentially probiotic acai yoghurt. **International Journal of Dairy Technology**, v. 61, p. 178-182, 2008.
- ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends Food Science and Technology**, v. 18, n. 5, p. 240– 251, 2007.
- ANAL, A. K.; STEVENS, W. F. Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. **International Journal Pharmaceutics**, v. 290, n. 1-2, p. 45-54, 2005.
- ANNAN, N. T.; BORZA, A. D.; TRUELSTRUP-HANSEN, L. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 41, p. 184-193, 2008.
- ANTUNES, A. E. C.; CAZETTO, T. F.; BOLINI, H. M. A. Viability of probiotic microorganisms during storage, postacidification and sensory analysis of fat-free yogurts with added whey protein concentrate. **International Journal of Dairy Technology**, v. 58, p. 169-173, 2005.
- ARAGON-ALEGRO, L. C.; ALEGRO, J. H. A.; CARDARELLI, H. R.; CHIU, M. C.; SAAD, S. M. I. Potentially probiotic and symbiotic chocolat mousse. **LWT – Food Science and Technology**, v. 40, n. 4, p. 669-675, 2007.

ARVANITOYANNIS, I.; HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, M. Functional foods: a survey of health claims, pros and cons, and current legislation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 385-404, 2005.

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis**. 18. ed. Gaithersburg, Maryland, 2005.

BAJPAI, S. K.; TANKHIWALE, R. Investigation of water uptake behavior and stability of calcium alginate/chitosan bi-polymeric beads. **Reactive and Functional Polymers**, v. 66, p. 645-658, 2006.

BENASSI, V. T.; WATANABE, E.; LOBO, A. R. Produtos de panificação com conteúdo calórico reduzido. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, p. 225-242, 2001.

BENKOUIDER, C. The world's emerging markets. **Functional Foods and Nutraceuticals**, 2005. Disponível em: <http://www.functionalingredientsmag.com/article/Trends/the-world-s-emerging-markets.aspx>. Acesso em: 07 de agosto de 2014.

BERTOLINI, A. C. **Estabilidade de óleo essencial de laranja, linalol e citral microencapsulados em goma arábica por atomização**. 1999. Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1999.

BONDT, V. Novas Tendências para Bebidas Funcionais. **Revista Brasil Alimentos**, São Paulo, v. 1, n. 18, p. 26-27. 2003.

BORGOGNA, M.; BELLICH, B.; ZORZIN, L.; LAPASIN, R.; CESÀRO, A. Food microencapsulation of bioactive compounds: rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. **Food Chemistry**, v. 122, n. 2, p. 416-423, 2010.

BOSCARIOLI, M. P. M. **Influência de prebióticos na encapsulação de bactérias probióticas adicionadas em sorvete**. 2010. Dissertação (Mestrado) da Escola de Engenharia Mauá - Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, 2010.

BRANDS, C. M. J.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. Reactions of monosaccharides during heating of sugar-casein Systems: buiding of a reaction network model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4667-4675, 2001.

BRASIL, 2012. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC Nº 54 de 12 de novembro de 2012. **Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar**. Disponível em: [www.portal.anvisa.gov.br](http://www.portal.anvisa.gov.br). Acesso em 19 de junho de 2015.

BRASIL, 2001. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, de 10 de janeiro de 2001.

BRASIL, 2003. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa N° 62, 26 de Agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União de 18/09 2003, Seção 1, Página 14**. Ministério da Agricultura, 2003a.

BRASIL, 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC N° 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 23 dez. 2003b**.

BRASIL, 2006. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa N° 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial da União de 14/12/2006, Seção 1, Página 8, 2006**.

BRASIL, 2008. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Brasília, 2008. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em: 06 out. 2013.

BRASIL, 2011. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa N° 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União de 30/12/2011, Seção**. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa N° 16, de 23 de agosto de 2005. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea. **Diário Oficial da União, Brasília, DF, 24 agosto 2005, sec.1, p. 7**.

BRASIL, 1997. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria N° 354, de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de doce de leite. **Diário Oficial da União de 08/09/1997, Seção 1, Página 19685, 1997**.

BRASIL, 1998. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria SVS/MS N° 27, de 13 de Janeiro de 1998. Informação nutricional complementar. **Diário Oficial da União. 1998**.

BRASIL, 1999. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução N° 19, de 30 de abril de 1999**. Regulamento técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=110&word=Alimentos%20Funcionais>. Acesso em: 16 de junho de 2015.

BRASIL, 1999. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução n° 386 de 05 agosto de 1999**. Regulamento técnico sobre Aditivos utilizados segundo as boas práticas de fabricação e suas funções. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/386\\_99.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/386_99.htm)> Acesso em: 14 de outubro de 2013.

- BRUSICK, D.; GROTZ, V. L.; SLESINSKI, R.; KRUGER, C. L.; HAYES, A. W. The absence of genotoxicity of sucralose. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3067-3072, 2010.
- BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 467-483, 2011.
- BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Torino, v. 137, n. 2-3, p. 121-129, 2010.
- BURITI, F. C. A.; KOMATSU, T. R.; SAAD, S. M. I. Activity of passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*) pulps on *Lactobacillus acidophilus* in refrigerated mousses. "Short Communication". **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 315-317, 2007.
- BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; 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. 173-180, 2005.
- CAPELA, P.; HAY, T. K. C.; SHAH, N. P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. **Food Research International**, v. 39, n. 2, p. 203-211, março 2006.
- CARDARELLI, H. R.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; ALEGRO, J. H. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Effect of inulin and *Lactobacillus paracasei* on sensory and instrumental texture properties of functional chocolate mousse. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 8, p. 1318-1324, 2008.
- CASTANHEIRA, A. G. C. **Controle de qualidade de leite e derivados: manual basico**. Ed. Cap Lab, São Paulo, 2. ed. v. 1, p. 368, 2012.
- CASTRO-CISLAGHI, F. P.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; 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.
- CHAMPAGNE, C. P.; BLAHUTA, N.; BRION, F.; GAGNON, C. A vortex-bowl disk atomizer system for the production of alginate beads in a 1500-liter fermentor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, n. 6, p. 681-688, 2000.
- 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.
- CHAMPAGNE, C.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 184-190, 2007.

- CHAN, E. S.; LEE, B. B.; RAVINDRA, P.; PONCELET, D. Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 338, n. 1, p. 63-72, 2010.
- CHAN, E. S.; WONG, S. L.; LEE, P. P.; LEE, J. S.; TI, T. B.; ZHANG, Z.; PONCELET, D.; RAVINDRA, P.; PHAN, S. H.; YIM, Z. H. Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 225-232, 2011.
- CHANDRAMOULI, V.; KAILASAPHATY, K.; PEIRIS, P.; JONES, M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. **Journal of Microbiological Methods**. v. 56, n. 1, p. 27-35, 2004.
- CHAR, C.; GUERRERO, S.; GONZÁLEZ, L.; ALZAMORA, S. M. Growth Response of *Eurotium chevalieri*, *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium brevicompactum* in Argentine Milk Jam. **Food Science and Technology International**, v. 11, n. 4, p. 297-305, 2005.
- CHÁVARRI, M.; MARAÑÓN, I.; ARES, R.; IBÁÑEZ, F. C.; MARZO, F.; VILLARÁN, M. del C. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**. v. 142, p. 185-189, 2010.
- CHÁVEZ, B. E.; LEDEBOER, A. M. Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. **Drying Technology**, v. 25, n. 7-8, p. 1193-1201, 2007.
- CHEN, J. Surface texture of foods: Perception and characterization. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 47, n. 06, p. 583-598, 2007.
- CHEN, L.; SUBIRADE, M. Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. **Biomaterials**. v. 27, n. 26, p. 4646-4654, 2006.
- CHEN, M. J.; CHEN, K. N. Applications of probiotic encapsulation in dairy products. In: LAKKIS, J. M. (Ed.), **Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems**. Wiley-Blackwell, USA, 2007. pp. 83-107.
- CODEX ALIMENTARIUS. **Proposed draft amendments of the codex general standard for food additives**. 2005. Disponível em: [www.codexalimentarius.net](http://www.codexalimentarius.net). Acessado em: 21 de janeiro de 2015.
- COLOMBO, M.; PERRONE, I. T.; STEPHANI, R.; SILVA, P. H. F. Avaliação da viscosidade durante a fabricação do doce de leite tradicional adicionado de amido de milho nativo. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, p. 7-13, 2009.
- COMAN, M. M.; CECCHINI, C.; VERDENELLI, M. C.; SILVI, S. ORPIANESI, C.; CRESCI, A. Functional foods as carriers for SYN BIO®, a probiotic bacteria combination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, p. 346-352, 2012.
- COOK, M. T.; TZORTZIS, G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; KHUTORYANSKIY, V. V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 56-67, 2012.

- CORRÊA, S. B. M.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Probiotic potential and sensory properties of coconut flan supplemented with *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*, during shelf life of the product. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 9, p. 1560-1568, 2008.
- CROUZIER, T.; BOUDOU, T.; PICART, C. Polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, p. 417-426, 2010.
- 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.
- DE WIT, J. N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal Dairy Science**, v. 81, n. 3, p. 597-608, 1998.
- DEMIATE, I. M.; KONKEL, F. E.; PEDROSO, R. A. Avaliação de qualidade de amostras comerciais de doce de leite pastoso – composição química. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 108-114, jan./abril, 2001.
- DESAI, K. G.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005.
- DEVRIESE, L. A.; POT, B.; COLLINS, M. D. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 399-408, 1993.
- DOHERTY, S. B.; GEE, V. L.; ROSSA, R. P.; STANTONA, C.; FITZGERALD, G. F.; BRODKORB, A. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1604-1617, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.12.012>>. Acesso em: 12 junho de 2014. doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.12.012.
- 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.
- DRAGET, K. I. Alginates. Em: **Handbook of hydrocolloids**. Cambridge, Inglaterra: Woodhead Publishing Limited, 2007. 379-395 p.
- DUNNE, C.; O'MAHONY, L.; MURPHY, L.; THORNTON, G.; MORRISSEY, D.; O'HALLORAN, S.; FEENEY, M.; FLYNN, S.; FITZGERALD, G.; DALY, C.; KIELY, B.; O'SULLIVAN, G. C.; SHANAHAN, F.; COLLINS, J. K. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 386-92, 2001.
- ETCHEPARE, M. A. **Produção, caracterização e viabilidade de micropartículas com *Lactobacillus acidophilus* obtidas por gelificação iônica**. 2014. Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014. 120 p.



FAO/WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. **Health and Nutritional properties of alginate in food**. 2001. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/006/y4765e/y4765e08.htm>. Acessado em 26/04/2015.

FAO/WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London. Ontario, Canada. April 30 and May 1, 2002.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, abr./jun. 2008.

FDA (Food and Drug Administration). **Food additives permitted for direct addition to food for human consumption: sucralose** [21CFR Part 172; Docket No. 87F-0086]. Fed. Reg. US 63, 16417-16433, 1998.

FDA (Food, Drug Administration). **Food additives permitted for direct addition to food for human consumption: sucralose** [21CFR Part 172; Docket No. 99F-0001]. Fed. Reg. US 64, 43908-43909, 1999. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/081299b.txt>>. Acessado em 14 de outubro de 2013.

FDA (Food, Drug Administration). **Probiotics**. New York, 2004. Disponível em: <[http://www.webdietitians.org/Public/GovernmentAffairs/92\\_adap1099.cfm](http://www.webdietitians.org/Public/GovernmentAffairs/92_adap1099.cfm)>. Acesso em 06 out. 2013.

FERREIRA, L. O. **Elaboração de Doce de Leite com Café e Soro de Queijo**. 2009. Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2009.

FERREIRA, L. O.; PIMENTA, C. J.; PINHEIRO, A. C. M.; PEREIRA, P. A. P.; SANTOS, G. Sensory evaluation of “*dulce de leche*” with coffee and whey using different affective data analysis methods. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, Campinas. v. 31, n. 4, p. 998-1005, 2011.

FERREIRA, V. L. P.; HOUGH, G.; YOTSUYANAGI, K. Cor de doce de leite pastoso. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 9, n. 2, p. 134-145, 1989.

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

FLORIS, R.; BODNÁR, I.; WEINBRECK, F.; ALTING, A. C. Dynamic rearrangement of disulfide bridges influences solubility of whey protein coatings. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 566-573, 2008.

FOOKS, L. J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotic, probiotic and human gut microbiology. **International dairy journal**, v. 9, p. 53-61, 1999.

FRANCK, A. Food applications of prebiotics. In GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. **Handbook of prebiotics**. Boca Raton: CRC Press, 2008, cap. 22, p. 437-448.

- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 196p.
- FRANCO, G. V. E. **Tabela de composição química dos alimentos**. 7. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1986. 145 p.
- FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H.; STILES, M. E. Enterococci at the crossroads of food science? **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, n. 1-24, 1999.
- FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H. The enterococci. In: MOTARJEMI, Y.; ADAMS, M. **Emerging Foodborne Pathogens**. Ed. Woodhead Publishing, p. 557-613, 2006.
- FRANZ, C. M. A. P.; HUCH, M.; ABRIOUEL, H.; HOLZAPFEL, W.; GÁLVEZ, A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. **Int J Food Microbiol.**, v. 151, n. 2, p. 125-40, 2011.
- FUNAMI, T.; FANG, Y.; NODA, S.; ISHIHARA, S.; NAKAUMA, M.; DRAGET, K. I.; NISHINARI, K.; PHILLIPS, G. O. Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca<sup>2+</sup> binding. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1746-1756, 2009.
- GARCIA CRUZ, C.; FOGGETTI, U.; SILVA, A. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1800-1806, 2008.
- GARCÍA, F. E. V.; CARDONA, L. J. M. Shelf life calculation for a low in calories milk caramel. **Rev. Lasallista Investig**, v. 6, n. 1, 2008.
- GARCÍA, F. E. V.; CARDONA, L. J. M.; HERRERA, N. R. Evaluación de los efectos en las propiedades fisicoquímicas, sensoriales y texturales de polidextrosa, fructosa y sorbitol como sustitutos de azúcar en la elaboración de arequipe. **Revista Lasallista de Investigación**, v. 5 n. 2, 2008.
- GARDINER, G. E.; O'SULLIVAN, E.; KELLY, J.; AUTY, M. A. E.; FITZGERALD, G. F.; COLLINS, J. K.; ROSS, R. P.; STANTON, C. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2605-12, 2000.
- GBASSI, G. K.; VANDAMME, T.; ENNAHAR, S.; MARCHIONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 1, p. 103-105, 2009.
- GIBBS, S. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Science and Nutrition**. v. 50, n. 3, p. 213- 224, 1999.
- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.
- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. **Handbook of prebiotics**. CRC Press, p. 471-473, 2008.

GILL, H. S. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 5, p. 755-773, 2003.

GOMES, C. R.; VISSOTTO, F. Z.; FADINI, A. L.; FARIA, E. V.; LUIZ, AM. M. Influência de diferentes agentes de corpo nas características reológicas e sensoriais de chocolates diet em sacarose e *light* em calorias. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 27, n. 3, p. 614-623, 2007.

GRICE, H. C.; GOLDSMITH, L. A. Sucralose – an overview of the toxicity data. **Food Chem. Toxicol**, v. 38, p. 1-6, 2000.

GROTZ, V. L.; MUNRO, I. C. An overview of the safety of sucralose. **Regul. Toxicol. Pharmacol**, v. 55, p. 1-5, 2009.

GUIMARÃES, I. C. O.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; PIMENTA, C. J.; FERREIRA, L. O.; FERREIRA, E. B. Development and description of *light* functional *dulce de leche* with coffee. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 36, n. 2, p. 195-203, 2012(a).

GUIMARÃES, I. C. O.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; PIMENTA, C. J.; TAVARES, L. S.; MENDES, J. F.; FERREIRA, E. B. Doce de Leite *Light* Funcional com Café: Um Estudo de Mercado. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, v. 67, n. 388, p. 53-59, Set./Out., 2012(b).

HALTHUR, T. J.; CLAESSEON, P. M.; ELOFSSON, U. M. Stability of polypeptide multilayers as studied by in situ ellipsometry: Effects of drying and post-buildup changes in temperature and pH. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 126, p. 17009-17015, 2004.

HANSEN, L. T.; ALLAN-WOJTAS, P. M.; JIM, L. A.; PAULSON, A. T. Survival of Calcium alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v. 19, p. 35-42, 2002.

HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid Extraction of Tissues with a Low-Toxicity Solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 90, p. 420-426, 1978.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 479-488, jul./ago., 2006.

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

HELGERUD, T.; GÅSERØD, O.; FJÆREIDE, T.; ANDERSEN, P. O.; LARSEN, C. Alginates. In: **Food stabilizers, thickeners and gelling agents**. United Kingdom: Wiley-Blackwell, 2010. p. 50-72.

HENTGES, D.; DA SILVA, D. T.; DIAS, P. A.; DA CONCEIÇÃO, R. C. S.; ZONTA, M. N.; TIMM, C. D. Pathogenic microorganism survival in *dulce de leche*. **Food Control**, v. 21, p. 1291-1293, 2010.

HOSSEINI, S. V.; ARLINDO, S.; BÖHME, K.; FERNÁNDEZ-NO, C.; CALO-MATA, P.; BARROS-VELÁZQUEZ, J. Molecular and Probiotic Characterization of Bacteriocin Producing *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 1392-1403, 2009.

HUFFMAN, L. M. Processing whey protein for use as a food ingredient. **Food Technology**, v. 50, p. 49-52, 1996.

HUSSEIN, H. S.; SAKUMA, T. Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 450-465, 2005.

IMESON, A. **Food stabilizers, thickeners and gelling agents**. Reino Unido: Wiley-Blackwell, 2010. 365 p.

IYER, C.; KAILASAPATHY, K. Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt. **J. Food Sci**, v. 70 p. 18-23, 2005.

IYER, C.; KAILASAPATHY, K.; PEIRIS, P. Evaluation of survival and release of encapsulated bacteria in *ex vivo* porcine gastrointestinal contents using a green fluorescent protein gene labeled *E. coli*. **Lebens Wissens Technol**, v. 39, p. 639-642, 2004.

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

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712p.

JONES, G. O.; LESMES, U.; DUBIN, P.; McCLEMENTS, D. J. Effect of polysaccharide charge on formation and properties of biopolymer nanoparticles created by heat treatment of b-lactoglobulin–pectin complexes. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 374-383, 2010.

JONES, O. G.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS, D. J. Comparison of protein–polysaccharide nanoparticle fabrication methods: Impact of biopolymer complexation before or after particle formation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 344, p. 21-29, 2010.

JUN-XIA, X.; HAI-YAN, Y.; JIAN, Y. Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1267-1272, 2011.

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

KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yogurt. **LWT – Food Science and Technology**, v. 39, n. 10, p. 1221-1227, 2006.

KANMANI, P.; KUMAR, R. S.; YUVARAJ, N.; PAARI, K. A.; PATTUKUMAR, V.; ARUL, V. Effect of cryopreservation and microencapsulation of lactic acid bacterium *Enterococcus faecium* MC13 for long-term storage. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58-59, p. 140-147, 2011.

KASRA-KERMANSHAHI, R.; FOOLADI, J.; PEYMANFAR, S. Isolation and microencapsulation of *Lactobacillus* spp. from corn silage for probiotic application. **Iranian Journal of Microbiology**. v. 2, n. 2, p. 98-102, 2010.

KLAYRAUNG, S.; VIERNSTEIN, H.; OKONOGI, S. Development of tablets containing probiotics: effects of formulation and processing parameters on bacterial viability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 370, n. 1-2, p. 54-60, 2009.

KOO, S. M.; CHO, Y. H.; HUH, C. S.; BACK, Y. J.; PARK, J. Y. Improvement of the stability of *Lactobacillus casei* YIT 9018 by microencapsulation using alginate and chitosan. **Journal of Microbiology and biotechnology**, v. 11, p. 376-383, 2001.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 1, p. 3-13, 2003.

LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

LANKALAPALLI, S.; KOLAPALLI, V. R. M. Polyelectrolyte Complexes: A Review of their Applicability in Drug Delivery Technology. **Indian Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 5, p. 481-487, 2009.

LE LEU, R. K.; HU, Y.; BROWN, I. L.; WOODMAN, R. J.; YOUNG, G. P. Symbiotic intervention of *Bifidobacterium lactis* and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 2, p. 246-251, 2009.

LEE, K. Y.; HEO, T. R. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 66, p. 869-873, 2000.

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.

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

LUPO, P. B.; GONZÁLES, A. C.; MAESTRO, G. A. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. **Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v. 3, n. 1, p. 130-151, 2012.

MADRONA, G. S.; ZOTARELLI, R. B.; BRANCO, I. G. Estudo do efeito da adição de soro de queijo na qualidade sensorial do doce de leite pastoso. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 4, n. 29, p. 826-833, out./dez., 2009.

MAESTRELLI, F.; CIRRI, M.; CORTI, G.; MENNINI, N.; MURA, P. Development of enteric-coated calcium pectinate microspheres intended for colonic drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 2, p. 508-518, 2008.

MERFIL, P. H. M. **Microencapsulação de óleo de palma por coacervação complexa em matrizes de gelatina/goma arábica e gelatina/alginato**. 2014. Tese (Doutorado) do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2014.

MARK, D.; HAEBERLE, S.; ZENGERLE, R.; DUCREE, J.; VLADISA, V.; GORAN, T. Manufacture of chitosan microbeads using centrifugally driven flow of gel-forming solutions through a polymeric micronozzel. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 336, n. 2, p. 634-641, 2009.

MARTIN, M. J.; LARA-VILLOSLADA, F.; RUIZ, M. A.; MORALES, M. E. Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, p. 480-486, 2013.

MARTINS, J. F. P.; LOPES, C. N. **Doce de leite: aspectos da tecnologia de fabricação**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1981, p. 1-37.

MATSUBARA, S. Alimentos Funcionais: Uma tendência que abre perspectivas aos laticínios. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. 6, n. 34, p. 10-18, 2001.

McDOWELL, R. H. **Properties of alginates**. Alginate Industries Ltd: Londres.1997. 67 p.

MENEZES, C. R.; BARIN, J. S.; CHICOSKI, A. J.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, v. 43, n. 7, p. 1309-1316, 2013.

MILAGRES, M. P.; DIAS, G.; MAGALHÃES, M. A.; SILVA, M. O.; RAMOS, A. M. Análise físico-química e sensorial de doce de leite produzido sem adição de sacarose. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 57, n. 4, p. 439-445, 2010.

MITTAL, S.; BAJWA, U. Effect of fat and sugar substitution on the quality characteristics of low calorie milk drinks. **J Food Sci Technol**, v. 49, n. 6, p. 704-712, 2012.

MOFIDI, N.; AGHAI-MOGHADAM, M.; SARBOLOUKI, M. N. Mass preparation and characterization of alginate microspheres. **Process Biochemistry**. v. 35, n. 9, p. 885-888, 2000.

MONTAN, M. As fibras invisíveis. **Revista Brasil Alimentos**, São Paulo, v. 4, n. 19, p. 28-29, 2003.

MORTAZAVIAN, A. M.; RAZAVI, S. H.; EHSANI, M. R.; SOHRABVANDI, S. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 1-18, 2007.

MOURA, M. R.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Hidrogéis semi-IPN baseados em rede de Alginato de  $\text{Ca}^{2+}$  com PNIPAAm entrelaçado: Propriedades hidrofílicas, morfológicas e mecânicas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 02, p. 132-137, 2008.

MUKAI-CORRÊA, R. **Preparo e caracterização de microcápsulas obtidas por polimerização iônica para alimentação de larvas de peixes**. 2003. Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

MULLER, V. Alimentos Funcionais. **Revista Laticínios**, São Paulo, v. 6, n. 34, p. 18-22, 2001.

NEVEN, E. Inulina e oligofrutose – ingredientes multifuncionais para o desenvolvimento de produtos lácteos. **Revista Leite e Derivados**, São Paulo, v. 11, n. 6, p. 32-37, 2001.

NIELSEN, A. F.; BERTELSEN, P.; KRISTENSEN, H. G.; HOYGAARD, L. Helium pycnometry as a tool for assessment of sealing efficiency in microencapsulation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, In Press, 2007.

NITSCHKE, M.; UMBELINO, D. C. Frutoooligossacarídeos: Novos Alimentos Funcionais. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 36, n. 1, p. 27-34, 2002.

NOGUEIRA, G. F. **Produção e caracterização de micropartículas com Multicamadas obtidas por gelificação iônica associada à Interação eletrostática**. 2013. Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2013.

O'SULLIVAN, D. J. Primary Sources of Probiotic Cultures. **Probiotics in food safety and human health**. Boca Ratón: Taylor & Francis, 2006.

OLIVEIRA, A. C. **Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por *spray drying* e leito de jorro**. 2006. Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

OLIVEIRA, A. R. C.; OLIVEIRA, R. M. E.; ABREU, P. S.; FERREIRA, L. O.; DOMICINIANO, D.; PINTO, S. M. Qualidade Microbiológica de Doces de Leite Comercializados no Sul de Minas Gerais. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, v. 67, n. 388, p. 11-14, Set./Out., 2012.

OZER, D.; AKIN, S.; OZER, B. Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in acidophilus-bifidus yoghurt. **Food science technology international**, v. 11, n. 1, p. 19-24, 2005.

PACHECO, M. T. B.; DIAS, N. F. G.; BALDINI, V. L. S.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados proteicos de soro de leite. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 333-338, abr.-jun. 2005

- PASIN, B. L.; AZON C. G; GARRIGA, A. M. Microencapsulación com alginato em alimentos. Técnicas y aplicaciones. **Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v. 3, n. 1, p. 130-151, 2012.
- PATIL, J. S.; KAMALAPUR, M. V.; MARAPUR, S. C.; KADAM, D. V. Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, n. 1, p. 241- 248, 2010.
- PAULETTI, M.; CALVO, C.; IZQUIERDO, L.; COSTELL, E. Color and texture of *Dulce de leche*, a confectionery dairy product – Selection of instrumental methods for industrial quality control. **Revista Española de Ciência y Tecnología de Alimentos**, v. 32, n. 3, p. 291-305, 1992.
- PAVLOVIC, S.; SANTOS, R. C.; SILVA, M. E.; GLORIA, M. B. A. Effect of processing on the nutritive value of Doce de leite, a typical Latin-American confectionery product. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 35, n. 4, p. 691-698, 1992.
- PÉREZ-CHABELA, M. L.; LARA-LABASTIDA, R.; RODRIGUEZ-HUEZO, E.; TOTOSAUS, A. Effect of Spray Drying Encapsulation of Thermotolerant Lactic Acid Bacteria on Meat Batters Properties. **J Appl Microbiol.**, v. 7, n. 4, p. 1392-403, 2009.
- PERRONE, I. T. in: CASTANHEIRA, A. G. C. **Controle de qualidade de leite e derivados: manual basico**. Ed. Cap Lab, São Paulo, 2. ed., v. 1, p. 368, 2012.
- PERRONE, I. T.; RENHE, I. R. T.; PEREIRA, J. P. F.; COLOMBO, M.; COELHO, J. S.; MAGALHÃES, F. A. R. Influência de diferentes espessantes nas características sensoriais do doce de leite para confeitaria. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v. 66, n. 379, p. 45-50, 2011.
- PERRONE, I. T.; STEPHANI, R.; NEVES, B. S.; SÁ, J. F. O.; CARVALHO, A. F. Atributos Tecnológicos de Controle para Produção do Doce de Leite. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, v. 67, n. 385, p. 42-51, 2012.
- PHILIPP, B.; DAUTZENBERG, H.; LINOW, K.; KOTZ, J.; DAWYDOFF, W. Polyelectrolyte complexes-recent developments and open problems. **Prog Polym Sci.**, v. 14, n. 91-172, 1989.
- PICOT, A.; LACROIX, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 505-515, 2004.
- PREVOST, H.; DIVIES, C. Cream fermentation by a mixed culture of lactococci entrapped in two-layer calcium alginate gel beads. **Biotechnol Lett**, v. 14, p. 583-588, 1992.
- RAMÍREZ-CHAVARÍN, N. L.; WACHER-RODARTE, C.; PÉREZ-CHABELA, M. L. Characterization and identification of thermotolerant lactic acid bacteria isolated from cooked sausages as bioprotective cultures. **Journal of Muscle Foods**, v. 21, p. 585-596, 2010.



RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da Qualidade de Carnes: Fundamentos e Metodologias**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. 599 p.

RANALLI, N.; ANDRÉS, S. C.; CALIFANO, A. N. Physicochemical and rheological characterization of “*dulce de leche*”. **Journal of Texture Studies**, v. 43, n. 2, p. 115-123, abril 2012.

RAO, A. V.; SHIWNARAIN, N.; MAHARAJ, I. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. **Canadian Inst Food Sci Technol J**, v. 22, p. 345-349, 1989.

REID, A. A.; CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N.; FUSTIER, P.; VUILLEMARD, J. C. Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 microentrapped in whey protein gel particles. **Journal of Food Science**, v. 72, p. M31-M37, 2007.

REID, G. Probiotics and prebiotics – progress and challenges. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 969-975, 2008.

RICHARDS, N. S. P. S.; SILVA, S. V.; BECKER, L. Parâmetros de qualidade de doces de leite comerciais. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 2007, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: EPAMIG, 2007. p. 477-480.

RICHERT, L.; LAVALLE, P.; PAYAN, E.; SHU, X. Z.; PRESTWICH, G. D.; STOLTZ, J. F.; SCHAAF, P.; VOEGEL, J. C.; PICART, C. Layer by Layer Buildup of Polysaccharide Films: Physical Chemistry and Cellular Adhesion Aspects. **Langmuir**, v. 20, n. 2, p. 448-458, 2004.

RODRÍGUEZ-HUEZO, M. E.; DURÁN-LUGO, R.; PRADO-BARRAGÁN, L. A.; CRUZ-SOSA, F.; LOBATO-CALLEROS, C.; ALVAREZ-RAMÍREZ, J.; VERNON-CARTER, E. J. Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. **Food Research International**, v. 40, p. 1299-1306, 2007.

ROMERO, G. C. A.; MALO, A. L.; PALOU, E. Propriedades del alginato y aplicaciones em alimentos. **Temas selectos de Ingeniería de Alimentos**, v. 7, n. 1, p. 87-96, 2013.

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

SÁ, J. O.; PERRONE, I. T.; MARTINS, M. F.; SILVA, P. H. F. Qualidade Microbiológica de Doces de Leite Pastosos. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, v. 67, n. 386, p. 61-66, Mai./Jun., 2012.

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

SABIKHI, L.; BABU, R.; THOMPSON, D. K.; KAPILA, S. Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 processing heat treatments and simulated gut conditions. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p. 586-593, 2010.

- SAIER, M. H.; MANSOUR, N. M. Probiotics and prebiotics in human health. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol**, v. 10, p. 22-25, 2005.
- SANTOS, J. P. V.; GOULART, S. M.; RAMOS, A. M. Influência da adição de inulina nas características físico-químicas e sensoriais do doce de leite cremoso. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v. 67, n. 388, p. 35-40, Set./Out., 2012.
- SANTOS, M. K. **Encapsulação de proteína em cápsulas de alginato, alginato-quitosana e estudos de estabilidade e liberação controlada em função do Ph**. 2014. Monografia (Bacharel em Química) Centro de Ciências Naturais e Humanas – Universidade Federal do ABC, Santo André, 2014. 23 p.
- SANTOS, R. C. S. **Microencapsulação de *Lactobacillus casei* por Spray Drying**. 2013. Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013, 104 p.
- SCHEREZENMEIR, J.; VERSE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics to approaching a definition. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 73, p. 3615-3645, 2001.
- SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and technofuncional properties of protein-polysaccharide complexes: review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, p. 689-753, 1998.
- SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; THOMAS, F.; HARDY, J. Complex coacervation between b-lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. **Food Hydrocolloids**, v. 13 p. 483-496, 1999.
- SCOTT, W. J. Water relation of food spoilage microorganisms. **Adv. Food**, v. 7, p. 83-127, 1957.
- SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**. v. 17, p. 1262-1277, 2007.
- SHEU, T. Y.; MARSHALL, R. T. Micro-encapsulation of *Lactobacilli* in calcium alginate gels. **J Food Sci**, v. 54, p. 557-561, 1993.
- SHEU, T. Y.; MARSHALL, R. T.; HEYMANN, H. Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 7, p. 1902-1907, 1993.
- SILVA, A. S.; HONJOYA, E. R.; INAY, O. M.; COSTA, M. R.; SOUZA, C. H. B. S.; SANTANA, E. H. W.; SUGUIMOTO, H. H.; ARAGON-ALEGRO, L. C. Viability of *Lactobacillus casei* in chocolate flan and its survival to simulated gastrointestinal conditions. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 33, n. 2, p. 3163-3170, 2012.
- SILVA, W. T. M.; NUNES, R. V.; POZZA, P. C.; POZZA, M. S. S.; APPELT, M. D.; EYNG, C. Avaliação de inulina e probiótico para frangos de corte. **Acta Scientiarum. Animal Sciences Maringá**, v. 33, n. 1, p. 19-24, 2011.

SIMEONI, C. P. S.; ETCHEPARE, M. A.; MENEZES, C. R.; FRIES, L. M.; MENEZES, M. F. C.; STEFANELLO, F. S. Microencapsulação de probióticos: inovação tecnológica na indústria de alimentos. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental – REGET**, v. 18, p. 66-75, maio de 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5902/2236117013020> . Acesso em: 05 de março de 2015.

SIMSEK-EGE, F. A.; BOND, G. M.; STRINGER, J. Polyelectrolyte Complex Formation between Alginate and Chitosan as a Function of pH. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 88, p. 346-351, 2003.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food: Product development, marketing and consumer acceptance: A review. **Appetite**, v. 51, n. 3, p. 456-467, 2008.

SOUZA JUNIOR, W. C. **Imobilização de células permeabilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 em alginato de cálcio e sua aplicação na hidrólise de galactoligossacarídeos**. 2006. Dissertação (Mestrado) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006. 67p.

SOUZA, C. H. B.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-chemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. **LWT Food Science and Technology**, v. 42, n. 2, p. 633-640, 2009.

SRIVASTAVA, S.; KOTOV, N. A. Composite Layer-by-Layer (LBL) Assembly with Inorganic Nanoparticles and Nanowires. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 12, p. 1831-1841, 2008.

SUKHORUKOV, G. B.; ANTIPOV, A. A.; VOIGT, A.; DONATH, E.; MÖHWALD, H. pH-Controlled Macromolecule Encapsulation in and Release from Polyelectrolyte Multilayer Nanocapsules. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 22, n. 1, 2001.

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

TIMM, C. D.; CONCEIÇÃO, R. C. S.; COELHO, F. J. O.; ROOS, T. B.; TEJADA, T. S.; QUEVEDO, P. S. Avaliação microbiológica de doce de leite pastoso. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 3, p. 275-277, 2007.

TIOURINA, O. P.; SUKHORUKOV, G. B. Multilayer alginate/protamine micro-sized capsules: encapsulation of -chymotrypsin and controlled release study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 155-161, 2002.

TRABULSI, L. R.; SAMPAIO, M. S. C. **Os probióticos e a saúde infantil. Estabelecimento e oscilações na composição da microflora intestinal e riscos a saúde**. Fascículo 2, São Paulo, Nestlé, 2000.

TRUELSTRUP-HANSEN, L.; ALLAN-WOJOTAS, P. M.; JIN, Y. L.; PAULSON, A. T. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. In milk and simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 35-45, 2002.

USDEC (UNITED STATES DAIRY EXPORT COUNCIL). **Manual de referência para produtos de soro dos EUA**. Arlington, 1997. 135 p.

VASCONCELOS, B. G. **Desenvolvimento de Mix de açaí probiótico, prebiótico e simbiótico**. São Paulo, 2010. Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

VEELKEN, M.; PAPE, H. Production of nekkomycin by immobilized *Streptomyces* cell physiological properties. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 19, n. 03, p. 146-152, 1984.

VERGIN, F. Anti- und probiotika. **Hippokrates** v. 25, p. 16-119, 1954.

VISSOTO, F. Z.; GOMES, C. R. Caracterização do comportamento reológico e da textura de chocolates sem sacarose. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 107-111, 2005.

VOS, P.; BUCKO, M.; GEMEINER, P.; NAVRÁTIL, M.; STIVEL, J.; FAAS, M.; STRAND, B. L.; SKJAK-BRAEK, G.; MORCH, Y. A.; VIKARTOVSKÁ, A.; LACIK, I.; KOLLÁRIKOVÁ, G.; ORIVE, G.; PONCELET, D.; PEDRAZ, J. L.; ANSORGE-SCHUMACHER, M. B. Multiscale requirements for biencapsulation in medicine and biotechnology, **Biomaterials**, v. 30, p. 2559-2570, 2009.

WORTHLEY, D. L.; LE LEU, R. K.; WHITEHALL, V. L.; CONLON, M.; CHRISTOPHERSEN, C.; BELOBRAJDIC, D.; MALLIT, K. A.; HU, Y.; IRAHARA, N.; OGINO, S.; LEGGET, B. A.; YOUNG, G. P. A human double-blind, placebo-controlled, crossover trial of prebiotic, probiotic, and symbiotic, supplementation: effects on luminal, inflammatory, epigenetic, and epithelial biomarkers of colorectal cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 90, n. 3, p. 578-586, 2009.

YABUR, B. Y.; HERNANDEZ, C. G. Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, n. 1, p. 43-53, 2007.

YEO, Y.; BAEK, N.; PARK, K. Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 6, n. 4, p. 213-230, 2001.

YING, D. Y.; PHOON, M. C.; SANGUANSRI, L.; WEERAKKODY, R.; BURGAR, I.; AUGUSTIN, M. A. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG Powders: Relationship of Powder Physical Properties to Probiotic Survival during Storage. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 9, p. 588-95. 2010.

YU, W.; YIM, T.; LEE, K.; HEO, T. Effect of skim milk-alginate beads on survival rate of *Bifidobacteria*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 6, p. 133-138, 2001.

ZOELLNER, S. S.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; BOLINI, H. M. A.; MOURA, M. R. L.; CARVALHO, L. M. J.; SANTANA, A. S. Whey beverage with acai pulp as food carrier of probiotic bacteria. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 64, p.165-169, 2009.

ZUIDAM, N. J.; SHIMONI, E. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. Em: **Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing**. Nova York, USA: Springer Science Business Media, 2010. p. 3-29.

ZULETA, A.; SAMBUCETTI, E. Inulin determination for food labeling. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 10, p. 4570-4572, 2001.