



LUCIANA MARQUES TORRES

**DOCES DE LEITE COM CAFÉ ADICIONADOS COM
PROBIÓTICO: CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE DURANTE
O ARMAZENAMENTO E SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL**

**LAVRAS-MG
2022**

LUCIANA MARQUES TORRES

**DOCES DE LEITE COM CAFÉ ADICIONADOS COM PROBIÓTICO:
CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO E
SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Carlos José Pimenta
Orientador
Prof. Dr. Diego Alvarenga Botrel
Coorientador

**LAVRAS-MG
2022**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Torres, Luciana Marques.

Doces de leite com café adicionados com probióticos:
caracterização e viabilidade durante o armazenamento e simulação
gastrointestinal / Luciana Marques Torres. - 2021.

123 p. : il.

Orientador(a): Carlos José Pimenta.

Coorientador(a): Diego Alvarenga Botrel.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Gelificação iônica externa. 2. Alimento funcional. 3. L
paracasei. I. Pimenta, Carlos José. II. Botrel, Diego Alvarenga. III.
Título.

LUCIANA MARQUES TORRES

**DOCES DE LEITE COM CAFÉ ADICIONADOS COM PROBIÓTICO:
CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO E
SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL**

**DULCE DE LECHE WITH COFFEE ADDED WITH PROBIOTICS:
CHARACTERIZATION AND VIABILITY DURING STORAGE AND
GASTROINTESTINAL SIMULATION**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 10 de dezembro de 2021.

Dra. Larissa de Oliveira Ferreira Rocha UFVJM

Dra. Sandra Maria Pinto UFLA

Dra. Elisângela Elena Nunes Carvalho UFLA

Dra. Sabrina Carvalho Bastos UFLA

Prof. Dr. Carlos José Pimenta
Orientador

**LAVRAS-MG
2022**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde, força, coragem e fé para enfrentar os obstáculos e realizar meus sonhos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realização desse curso. Em especial, ao professor Carlos José Pimenta, pela orientação, pela confiança e pelos ensinamentos. Não somente por isso, mas também pela compreensão, ética e competência. Trabalhar ao seu lado durante todos esses anos me acrescentou como pessoa e profissional.

Ao professor Diego Alvarenga Botrel, pela coorientação, sugestões e ensinamentos.

À professora Sandra Maria Pinto, pela disponibilidade, pela atenção e contribuição na realização deste trabalho.

Ao professor Luiz Ronaldo de Abreu, pelos conselhos e ensinamentos.

Ao professor Disney Ribeiro Dias, pelo acolhimento e por disponibilizar o laboratório para a realização das análises.

À professora Olga Lucía Mondragón-Bernal, pela amizade, carinho e atenção.

À professora Maria Emília de Sousa Gomes, pela convivência, conselhos e amizade.

Ao professor José Guilherme Lembi Ferreira Alves, pela ajuda, conselhos e por disponibilizar o laboratório para a realização das análises.

À grande amiga Cleuza, pela ajuda, apoio, carinho e disponibilidade em sempre ajudar.

A todos os meus amigos do curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, em especial Mariá, Luara, Maria Cecília, Graziella, Daniela e Jéssica, pela amizade, ensinamentos e bondade em me auxiliar em tudo o que eu precisei.

Aos meus pais, Marco e Tina, pelo carinho, amor, incentivo, exemplo de vida, de bondade e de dedicação e por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu esposo Ramon, pela paciência, amor, carinho e compreensão. Sem você nada disso seria possível.

À minha filha Elisa, por ser minha fonte de alegria e meu combustível nos dias mais difíceis.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO GERAL

A microencapsulação é utilizada para conferir proteção e manter a viabilidade de cepas probióticas durante o processamento, armazenamento e às condições adversas do trato gastrointestinal. O objetivo do trabalho foi desenvolver doces de leite com café reduzidos em gorduras adicionados de microesferas probióticas. Na microencapsulação dos probióticos testados foi utilizada a técnica de gelificação iônica externa com atomização por ar pressurizado utilizando o bico tipo *spray* duplo fluido do equipamento Spray Dryer. Para a realização da escolha da cepa foi realizada a microencapsulação de *L. paracasei* e *L. acidophilus*, e as características físicas, eficiência de microencapsulação, resistência térmica e viabilidade em condições gastrointestinais simuladas e no armazenamento por 90 dias a 4 °C foram avaliadas. As cepas microencapsuladas de *L. paracasei* apresentaram maior eficiência de encapsulação e viabilidade durante o armazenamento por 90 dias a 4 °C, de 7,82 log UFC/g. Em comparação a *L. acidophilus*, mantiveram contagens acima de 6 log UFC/g em 20 minutos de exposição a temperatura de 70 °C e mantiveram viabilidade acima de 7,20 log UFC/g em condições gastrointestinais simuladas. Dessa forma, células microencapsuladas de *L. paracasei* foram escolhidas para serem aplicadas aos doces de leite com café. A viabilidade das microesferas de *L. paracasei* adicionadas aos doces de leite convencional e *light* foram avaliadas durante todo o tempo de armazenamento e às condições gastrointestinais. Foi possível elaborar doces de leite convencional e *light* com café com redução de 37,0% no teor de gordura e de 19,30% no teor de açúcares. As adições das microesferas nos doces de leite não influenciaram significativamente na textura e os doces de leite que receberam a microesferas apresentaram coloração mais clara. O padrão microbiológico para coliformes totais, *Salmonella* sp, *Staphylococcus coagulase* positiva e fungos e leveduras dos doces de leite com café atenderam aos requisitos da legislação. Após o término do tempo de 90 dias de armazenamento a 4 °C, as células microencapsuladas apresentaram viabilidade média de 7,13 log UFC/g em doces de leite convencional e *light* com café e uma porção diária (20 g) de doce de leite forneceria $2,7 \times 10^8$ UFC/20g de *L. paracasei*. Em condições gastrointestinais simuladas após 90 dias de armazenamento, a viabilidade das células livres foram menores e as das microencapsuladas apresentaram quantidades suficientes para alegação de produto funcional. O doce de leite com café mostrou-se como um bom veículo alternativo para *L. paracasei* microencapsulado.

Palavras-chave: Gelificação iônica externa. Alimento funcional. *L. paracasei*. *Light*.

GENERAL ABSTRACT

Microencapsulation is used to provide protection and maintain the viability of probiotic strains during processing, storage, and adverse conditions in the gastrointestinal tract. The objective of the work was to develop dulce de leche with coffee reduced in fats added with probiotic microspheres. In the microencapsulation of the probiotics tested probiotics the technique of external ionic gelation with atomization by pressurized air was used using the two-fluid air atomizing nozzle of the Spray Dryer Equipment. To select the strain, microencapsulation of *L. paracasei* and *L. acidophilus* was performed, and the physical characteristics, microencapsulation efficiency, thermal resistance, and viability in simulated gastrointestinal conditions and storage for 90 days at 4 °C were evaluated. The microencapsulated strains of *L. paracasei* showed higher encapsulation efficiency and viability during storage for 90 days at 4 °C, of 7.82 log CFU/g. Compared to *L. acidophilus*, they maintained counts above 6 log CFU/g in 20 minutes of exposure to a temperature of 70 °C and maintained viability above 7.20 log CFU/g in simulated gastrointestinal conditions. Thus, microencapsulated cells of *L. paracasei* were chosen to be applied to dulce de leche with coffee. The viability of *L. paracasei* microspheres added to conventional and light dulce de leche was evaluated throughout the storage period and at gastrointestinal conditions. It was possible to prepare conventionally and light dulce de leche with coffee with a reduction of 37.0% in the fat content and 19.30% in the sugar content. The additions of the microspheres in the dulce de leche did not significantly influence the texture and the dulce de leche that received the microspheres showed a lighter color. The microbiological standard for total coliforms, *Salmonella* sp., coagulase-positive staphylococci and fungi and yeasts in dulce de leche with coffee met the requirements of the legislation. After 90 days of storage at 4 °C, the microencapsulated cells showed average viability of 7.13 log CFU/g in conventional and light dulce de leche with coffee and a daily serving (20 g) of dulce de leche would provide 2.7×10^8 CFU/20g of *L. paracasei*. In simulated gastrointestinal conditions after 90 days of storage, the viability of free cells was lower and those of microencapsulated cells presented sufficient amounts to claim a functional product. Dulce de leche with coffee proved to be a good alternative vehicle for microencapsulated *L. paracasei*. In simulated gastrointestinal conditions after 90 days of storage, the viability of free cells was lower and those of microencapsulated cells presented sufficient amounts to allegation a functional product. Dulce de leche with coffee proved to be a good alternative vehicle for microencapsulated *L. paracasei*.

Keywords: External ionic gelation. Functional food. *L. paracasei*. Light.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	8
1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Alimentos funcionais	12
2.1.1	Probióticos	13
2.2	Microencapsulação de probióticos	15
2.2.1	Alginato	16
2.2.2	Gelificação iônica externa	19
2.2.3	Atomização	21
2.3	Doce de leite	22
2.4	Desenvolvimento de doce de leite funcional	26
2.4.1	Sucralose	28
2.4.2	Café	29
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
	REFERÊNCIAS	32
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	45
	ARTIGO 1 - CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE DE <i>LACTOBACILLUS PARACASEI</i> E <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> MICROENCAPSULADOS	46
	ARTIGO 2 – DOCES DE LEITE COM CAFÉ ADICIONADOS DE <i>L. PARACASEI</i>: CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO E SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL	79

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O mercado de alimentos funcionais cresceu expressivamente nos últimos anos, colocando à disposição dos consumidores diversos produtos (SOUSA *et al.*, 2015). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 1999) define alegação de propriedade funcional “aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano”.

O termo probióticos deriva da língua grega e significa “para a vida” e esses são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do indivíduo (ANVISA, 2018; HILL *et al.*, 2014).

Os probióticos exercem seus benefícios por meio de cinco diferentes mecanismos de ação: produção de substâncias inibitórias e antimicrobianas; competição com bactérias patogênicas por nutrientes e locais de adesão; melhoria da função da barreira do revestimento epitelial; degradação de toxinas e bloqueia os seus receptores; e modula as respostas imunes (SÁNCHEZ *et al.*, 2017).

A ingestão de diferentes culturas probióticas oferece vários benefícios à saúde do consumidor, os mais importantes são: controle da microbiota intestinal; fortalecimento da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; estímulo da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos; redução da população de patógenos através da produção de ácidos acético e láctico, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos; melhoria da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose; estimulação do sistema imune; alívio da constipação; e ampliação da absorção de minerais e produção de vitaminas. Ainda que não comprovados, outros efeitos atribuídos a esses microrganismos são a diminuição do risco de câncer de cólon e de doença cardiovascular. São sugeridos, também, a redução das concentrações plasmáticas de colesterol, efeitos anti-hipertensivos, diminuição da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori*, controle da colite induzida por rotavírus e por *Clostridium difficile*, prevenção de infecções do aparelho urinário e genital, de osteoporose pós-menopausa, além de efeitos inibidores sobre a mutagenicidade (CHARTERIS *et al.*, 1998; DOWARAH; VERMA; AGARWAL, 2017; HUIDROM; BEG; MASOOD, 2021; JELEN; LUTZ, 1998; KLAENHAMMER, 2001; KAUR; CHOPRA; SAINI, 2002; SHAH, LANKAPUTHRA, 1997; SAAD, 2006; TUOHY *et al.*, 2003).

Pei-Shan *et al.* (2021) mostraram que um suplemento probiótico, contendo *L. salivarius* subsp. *salicinius* AP-32, *L. johnsonii* MH-68 e *L. reuteri* GL-104, aliviou os sintomas do diabetes tipo 2 em ratos, protegendo a função das células β e estabilizando os níveis glicêmicos.

Porém, para que esses benefícios sejam obtidos, é importante que os microrganismos cheguem viáveis ao intestino e sejam consumidos em uma concentração mínima de 10^8 - 10^9 UFC/recomendação diária do produto ou 10^6 - 10^7 UFC/mL ou g do alimento. O consumo dos probióticos deve ser seguro para o consumidor (ANVISA, 2018; FAO/WHO, 2002; LUYER *et al.*, 2005).

Muitos fatores durante o processamento e armazenamento dos alimentos afetam a sobrevivência de probióticos, o processo de secagem, o estresse oxidativo e a temperatura. Suco gástrico, sais biliares e outros constituintes do trato gastrointestinal também afetam os probióticos e impedem de exercerem efeitos benéficos (COOK *et al.*, 2012). Para manter a viabilidade dos probióticos durante o armazenamento e a digestão, a seleção de cepas resistentes, adaptação ao estresse, aplicação de protetores celulares e microencapsulação, foram propostas (CHEN *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2018; XIAO *et al.*, 2020).

A imobilização celular por encapsulamento envolve a proteção de células microbianas dentro de polímeros permeáveis a nutrientes, gases e metabólitos para manter a viabilidade celular dentro dos grânulos (DING; SHAH, 2009; JOHN *et al.*, 2011; RATHORE *et al.*, 2013).

A microencapsulação produz grânulos na faixa de tamanho de 1–1000 μm (HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2012). As microesferas são mais fortes mecanicamente do que as macrocápsulas, de tamanho menor, menos de 1000 μm , são preferidas na microencapsulação de cepas probióticas (RATHORE *et al.*, 2013). O produto probiótico microencapsulado ideal seria um pó seco, com facilidade de armazenamento e vida útil longa, ou um gel úmido com boa estabilidade em um produto alimentício (COOK *et al.*, 2012).

A microencapsulação por gelificação iônica externa é normalmente feita usando uma seringa e agulha, entretanto, sistemas de pulverização também têm sido utilizados, como bicos vibratórios (CHANDRAMOULI *et al.*, 2004), bicos atomizadores de ar (CUI *et al.*, 2000) e atomização de disco giratório (SENUMA *et al.*, 2000). O uso desses sistemas de pulverização reduz o tamanho das microesferas devido à extrusão da agulha e a utilização de alguns métodos de produção como a secagem por *spray* causam muitos danos às células (COOK *et al.*, 2012).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi desenvolver microesferas probióticas contendo *L. acidophilus* e *L. paracasei* por gelificação iônica externa por atomização por ar pressurizado utilizando o bico tipo *spray* duplo fluido do equipamento Spray Dryer, avaliar a viabilidade das cepas microencapsuladas durante o armazenamento a 4 °C por 90 dias, a resistência térmica e a viabilidade às condições gastrointestinais. Selecionar a cepa microencapsulada para adicionar em doces de leite com café, avaliar a viabilidade dos microrganismos durante o armazenamento, às condições gastrointestinais, bem como caracterizar os doces de leite com café produzidos com a formulação convencional e com redução de gorduras.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Alimentos funcionais

O alimento comercializado como funcional, normalmente, contém adicionados ingredientes tecnologicamente desenvolvidos com um benefício específico para a saúde (NIVA, 2007; SIRÓ *et al.*, 2008).

No Brasil, a Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 1999) define alegação de propriedade funcional “aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano”, e define como alegação de propriedade de saúde “aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde.” A Comissão de Ação Concertada de Alimentação Funcional na Europa (FUFOSE) define alimentos funcionais como “produto alimentício que só pode ser considerado funcional se, juntamente com o impacto nutricional básico, tiver efeitos benéficos sobre uma ou mais funções do organismo humano, melhorando assim as condições gerais e físicas ou/e diminuindo o risco da evolução das doenças” (SIRÓ *et al.*, 2008).

Os alimentos probióticos contém bactérias como *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Ainda não se conhece a composição ideal dos alimentos que poderiam estimular as propriedades probióticas “in vivo”. Os lactobacilos são bactérias gram-positivas e anaeróbicas facultativas, predominantes no intestino delgado. Entre suas espécies pode-se citar os *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus acidophilus* (FLESCH; POZIOMYCK; DAMIN, 2014; PARK; FLOCH, 2007).

A grande aceitação dos produtos alimentícios contendo probióticos incluídos na categoria de alimentos funcionais foram responsáveis pelo aumento do mercado global em US\$ 33 bilhões em 2000 para US\$ 176,7 bilhões em 2013, o que representa 60% - 70% do mercado total de alimentos funcionais. O mercado de alimentos probióticos foi avaliado em US\$ 46,17 bilhões em 2017 e está planejado para atingir US\$ 69,29 bilhões até 2023, a uma taxa anual de crescimento de 7% a partir de 2018 (LIU; COOK; ROUX, 2020; MISRA; PANDEY; MISHRA, 2021).

2.1.1 Probióticos

Os probióticos são benéficos para o hospedeiro quando administrados em quantidades apropriadas. Em geral, os produtos que contêm microrganismos probióticos devem conter um número mínimo de células viáveis entre 10^6 e 10^7 unidades formadoras de colônia por grama ou mililitros de produto final (UFC/g ou UFC/mL) de bactérias probióticas viáveis e ser seguro para o consumidor. Depende da cepa o mecanismo de ação dos probióticos e, para garantir um efeito benéfico contínuo, a dose diária mínima de probióticos deve apresentar concentrações entre 10^8 e 10^9 UFC/porção diária do produto, para obter os efeitos benéficos à saúde (FAO/WHO, 2002; LUYER *et al.*, 2005).

Para conferir efeitos benéficos no intestino, os probióticos utilizam vários mecanismos de ação (SHERMAN; OSSA; JOHNSON-HENRY, 2009). Ao colonizar provisoriamente o trato gastrointestinal, os probióticos servem para corrigir o desequilíbrio da microbiota intestinal. Isso pode ocorrer como consequência da resistência à colonização, isto é, capacidade que certas bactérias têm de interagir com as células epiteliais do intestino para evitar a aderência de patógenos entéricos aos locais de ligação na superfície epitelial. Os probióticos que colonizam o intestino podem exercer um efeito antimicrobiano direto, liberando produtos como as bacteriocinas que inibem o crescimento e a virulência de patógenos entéricos. Alguns probióticos aumentam a liberação de peptídeos antibacterianos chamados defensinas das células de Paneth. Probióticos produtores de ácido láctico podem reduzir o pH local do intestino e produzir um efeito antimicrobiano sobre os patógenos. Algumas cepas de probióticos interferem no sensor de densidade microbiana, um sistema pelo qual as bactérias aumentam sua virulência (ASAD; OPAL, 2008). Os probióticos aumentam a produção de mucinas das células epiteliais, que impedem a ligação de patógenos e funcionam como uma barreira antibacteriana. Os probióticos exercem um efeito anti-inflamatório no intestino, promovem a produção de IgA secretora no intestino que se liga aos patógenos, impedem a ativação de NF κ B (fator de transcrição pró-inflamatório) e IL-8 (um quimioatratador neutrófilo). Algumas cepas probióticas podem ativar os receptores opioides e canabinoides no intestino, atenuando a cólica visceral abdominal em pacientes com síndrome do intestino irritável (MIZOCK, 2015).

Eles podem auxiliar o corpo a combater infecções, especialmente nas superfícies colonizadas do trato gastrointestinal (SANDERS, 2003). Ouwehand, Salminen e Isolauri (2002)

afirmaram que, para ser considerado um probiótico, a cepa deve ter certas propriedades e funções, como resistência ácida e tolerância à bile, eliminação ou redução da adesão do patógeno, produção de ácido e bacteriocina desfavorecendo o crescimento de patógenos e assegurar a melhora do equilíbrio da microbiota intestinal (ARAGON-ALEGRO *et al.*, 2007).

As bactérias probióticas devem ser identificadas por gênero, espécie e nível de cepa. A maioria dos probióticos em uso clínico e em alimentos são espécies de três gêneros: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces* (MIZOCK, 2015).

As bactérias do ácido láctico são catalase negativas, não esporulantes, anaeróbias aerotolerantes, ácido-tolerantes, não reduzem nitrito, mesófilas e algumas termófilas, bacilos ou cocos (KLAENHAMMER *et al.*, 2005). Podem ser classificadas em homofermentativas, heterofermentativas ou facultativamente heterofermentativas, quanto ao modo de degradação dos carboidratos, sendo os grupos discriminados quanto aos produtos finais da fermentação. As espécies *Lactobacillus acidophilus* são homofermentativas e utilizam a via glicolítica para transformar o carbono principalmente em ácido láctico (AXELSSON, 2004). As cepas do grupo *Lactobacillus casei* são representantes do grupo facultativamente heterofermentativos, que fermentam hexoses em ácido láctico e podem produzir gás carbonico a partir de gliconato, mas não através da glicose. Essas bactérias também fermentam glicídios simples compostos por cinco carbonos, através de uma fosfoctolase induzida para produzir ácidos acético e láctico (AXELSSON, 2004, BURITI; SAAD, 2007).

Bactérias *Lactobacillus* são habitantes naturais do intestino humano, mas estão presentes em quantidades relativamente pequenas, mesmo em indivíduos que consomem probióticos (PFEILER; KLAENHAMMER, 2007). Eles afetam benéficamente a saúde humana, melhorando o equilíbrio da microbiota intestinal e as defesas contra patógenos (HEENAN *et al.*, 2004), constituindo um grupo de bactérias com inúmeras características morfológicas. As espécies mais conhecidas do gênero *Lactobacillus* consideradas probióticas são *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus rhamnosus* (HOLZAPFEL *et al.*, 2001).

Os alimentos são veículos para entrega de probióticos ao corpo humano, ajudam a proteger as cepas probióticas durante a passagem pelo trato gastrointestinal, controlam sua colonização e contêm outros ingredientes, como componentes bioativos, que podem interagir com as cepas para alterar sua funcionalidade e eficácia. O crescimento e a sobrevivência das cepas durante o trânsito

gastrointestinal são atingidos pela composição físico-química dos alimentos. As mesmas bactérias probióticas podem ter propriedades funcionais e tecnológicas diferentes na presença de ingredientes alimentares. Ingredientes alimentares prebióticos estimulam o crescimento de bactérias probióticas. A combinação apropriada de prebióticos e probióticos podem acumular maior potencial para um efeito sinérgico. A tendência para o uso de bactérias em diferentes sistemas alimentares deve ser criteriosa, considerando as vantagens e avaliando possíveis reduções na eficácia funcional e viabilidade dos probióticos, principalmente em matrizes alimentares não prebióticas. Assim, a seleção de sistemas alimentares adequados para fornecer probióticos é um fator imprescindível que deve ser considerado no desenvolvimento de alimentos probióticos funcionais (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

2.2 Microencapsulação de probióticos

De acordo com Anal e Singh (2007), a capacidade das cepas probióticas de sobreviverem e se desenvolverem no vetor influenciará diretamente em seus efeitos probióticos. Dessa forma, o microrganismo que é metabolicamente estável no produto e sobrevive à passagem pelo trato gastrointestinal chegando ao intestino com expressiva viabilidade poderá promover efeitos benéficos para a saúde. A utilização de processos de microencapsulação tem sido estudada como alternativa para manter a sobrevivência desses microrganismos nos produtos alimentícios.

O encapsulamento é um processo físico-químico ou mecânico para aprisionar uma substância em um material polimérico, afim de produzir pequenas partículas (CHEN; CHEN, 2007). A microencapsulação foi investigada para melhorar a viabilidade de algumas cepas em produtos derivados do leite e no trato gastrointestinal (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003; PICOT; LACROIX, 2004). A viabilidade das células probióticas depende das propriedades físico-químicas das partículas. Na verdade, o tipo e a concentração do material de parede, o tamanho, o número inicial de células e as bactérias são alguns parâmetros importantes de coordenar (CHEN; CHEN, 2007). No caso da encapsulação probiótica, o objetivo não é apenas proteger as células contra o ambiente adverso, mas também permitir sua liberação no intestino em estado metabolicamente ativo e com viabilidade significativa (PICOT; LACROIX, 2004). As microesferas obtidas devem permanecer íntegras na matriz alimentar e no estômago e suas

propriedades devem facilitar e permitir a liberação das células durante a passagem pela fase intestinal (BURGAIN *et al.*, 2011; DING; SHAH, 2007; PICOT; LACROIX, 2004).

A confecção de microesferas estáveis para imobilização de cepas probióticas começa com a escolha de um material de microencapsulação correto. Estudos têm mostrado que certos tipos de polímeros influenciam diretamente nas propriedades das microesferas (JEN; WAKE; MIKOS, 1996). As microesferas são produzidas com polímeros solúveis em água que fornecem um alto grau de permeabilidade para nutrientes e metabólitos de baixo peso molecular, gerando assim um ambiente ótimo para o metabolismo das células imobilizadas. Polímeros sintéticos e naturais solúveis em água estão sendo utilizados para microencapsulação de cepas probióticas (GROBOILLOT *et al.*, 1994; JOHN *et al.*, 2011; RATHORE *et al.*, 2013).

A técnicas mais utilizadas são extrusão, coacervação, secagem por *spray* e emulsificação (DE VOS *et al.*, 2010). A seleção do método é realizado de acordo com a aplicação das microesferas. As microesferas contendo células probióticas devem ser menores que 100 μm para evitar sensações sensoriais desagradáveis quando adicionadas em alimentos e consumidas (HANSEN *et al.*, 2002; HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2012). Já para uso em biorreatores de fermentação, as microesferas probióticas devem ser fortes mecanicamente para resistir a forças de cisalhamento, ambientes com pH ácidos, exposição a solventes e gases de fermentação. Assim, a técnica selecionada deve apresentar potencial de produzir microesferas com os atributos físicos/químicos desejáveis, evitando danos à integridade e mantendo a viabilidade celular (RATHORE *et al.*, 2013).

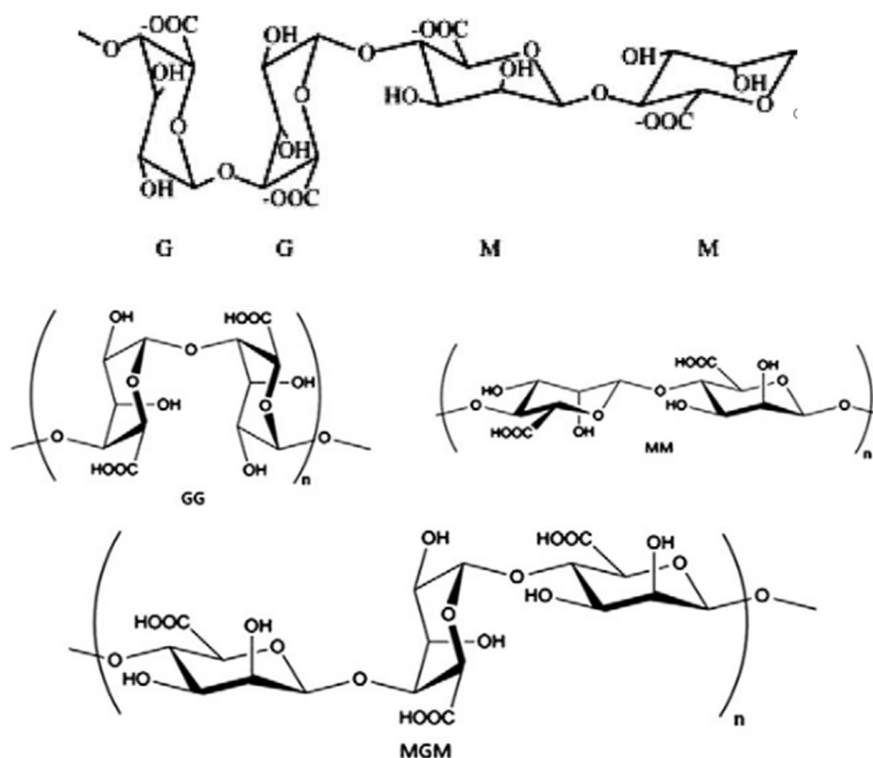
2.2.1 Alginato

O alginato ou ácido algínico é um polissacarídeo natural extraído de espécies de algas e composto pelos ácidos β -D-manurônico e α -L-gulurônico. A composição da cadeia de polímero varia em distribuição sequencial e quantidade conforme a sua fonte, o que influenciará em suas propriedades funcionais como material de parede. Os hidrogéis de alginato são amplamente utilizados na encapsulação de cepas probióticas (BURGAIN *et al.*, 2011; ROWLEY; MADLAMBAYAN; MOONEY, 1999) e é preferido para encapsular devido ao seu baixo custo, de fácil obtenção, biocompatível, atóxico e biodegradável, que não necessita da utilização de

solventes orgânicos e nem condições de altas ou baixas temperaturas, para a formação das partículas (GANGULY *et al.*, 2013; KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003).

A Figura 1 apresenta as estruturas de resíduos de ácido manurônico e gulurônico e a ligação entre esses resíduos em alginato.

Figura1 – Estrutura química dos vários blocos que formam o alginato.



Fonte: Cook *et al.* (2012) e George e Abraham (2006).

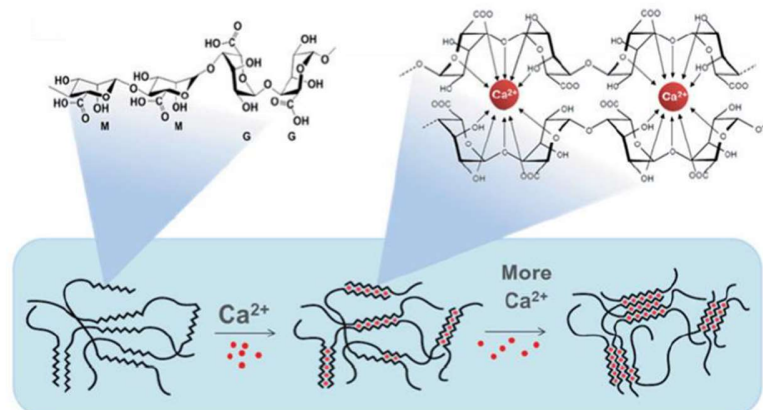
De acordo com as formas particulares dos monômeros e seus modos de ligação no polímero, as geometrias das regiões do bloco G e regiões do bloco M são significativamente diferentes. Os blocos G são dobrados enquanto os blocos M têm uma forma chamada de fita. Se duas regiões do bloco G estiverem alinhadas lado a lado, o resultado é uma concavidade em forma de diamante. Esta concavidade tem dimensões ideais para a ligação cooperativa de íons de cálcio. As regiões homopoliméricas de blocos de ácido β -D-manurônico e blocos de ácido α -L-gulurônico são regiões de estrutura alternada (GEORGE; ABRAHAM, 2006; HAUG; LARSEN; SMIDSRØD, 1967).

O peso molecular, a composição e a extensão das sequências determinam as propriedades físicas dos alginatos. A rigidez da cadeia não depende apenas da força iônica, mas também da

composição dos blocos do alginato, sendo a ordem de crescimento: bloco MG < bloco MM < bloco GG. Dependem fortemente das sequências desses blocos as propriedades físicas, mecânicas, ordem de flexibilidade e a reatividade, ou seja, a estabilidade contra a hidrólise ácida. Em condições de pH baixo no estado gel, blocos GG são mais estáveis em interações cooperativas entre cadeias do que blocos MM e blocos MG/GM (ANDRIAMANANTOANINA; RINAUDO, 2010; HECHT; SREBNIK, 2016; TEIXEIRA, 2021).

A característica mais importante dos alginatos é sua capacidade de formar géis por reação com cátions divalentes como o Ca^{2+} (GEORGE; ABRAHAM, 2006). O aumento de interações seletivas de cálcio é encontrado com o aumento do conteúdo de ácido α -L-gulurônico nas cadeias, enquanto que blocos β -D-manurônico e blocos MG alternados tem menor seletividade em relação ao íon. Essa seletividade de ligação iônica ocorre pela formação de “caixa de ovo”, associação de regiões da cadeia com maior número de grupo α -L-gulurônico (HECHT; SREBNIK, 2016). As micropartículas de alginato podem ser preparadas por extrusão de uma solução de alginato de sódio contendo a cepa desejada, como gotículas, em uma solução de reticulação divalente, como Ca^{2+} , Sr^{2+} ou Ba^{2+} . A reticulação do polímero acontece principalmente pela troca de íons de sódio dos ácidos gulurônicos com os cátions divalentes e o empilhamento desses grupos gulurônicos (GEORGE; ABRAHAM, 2006). A compatibilidade de alginatos em relação aos íons Ca^{2+} aumenta com o aumento do conteúdo do cátion no gel (HECHT; SREBNIK, 2016). Na relação estequiométrica de grupos $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$, os complexos são geralmente insolúveis e, como resultado, permite obter fibras, filmes, esferas ou cápsulas para diversas finalidades (ANDRIAMANANTOANINA; RINAUDO, 2010; TEIXEIRA, 2021). (FIGURA 2).

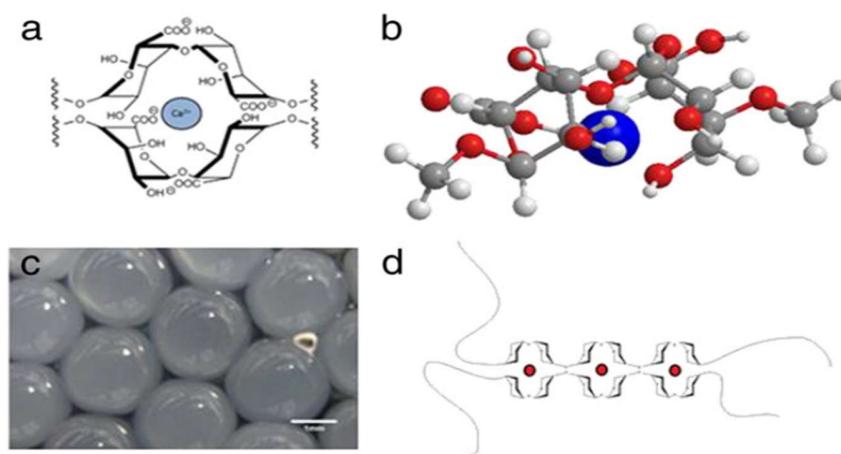
Figura 2 – Blocos de ácidos β -D-manurônico e α -L-gulurônico. Modelo “caixa de ovo”.



Fonte: Martins *et al.* (2017).

Concentrações maiores de íons cálcio, os resultados da gelificação iônica são ligações mais duráveis das cadeias (FIGURA 3). A estrutura química, o tamanho da molécula, a cinética de formação de gel e o cátion, influenciam em várias propriedades do gel de alginato, incluindo porosidade, comportamento de intumescimento, estabilidade, biodegradabilidade e sua força (GEORGE; ABRAHAM, 2006).

Figura 3 - Ligação de Ca^{2+} ao estilo de “caixa de ovo” em alginato (a), um dímero (ácido α -L-gulurônico - α -L-gulurônico) (b), microcápsulas de alginato (c) e um diagrama mostrando associação em cadeia por ligação de caixa de ovo (d).



Fonte: Cook *et al.* (2012).

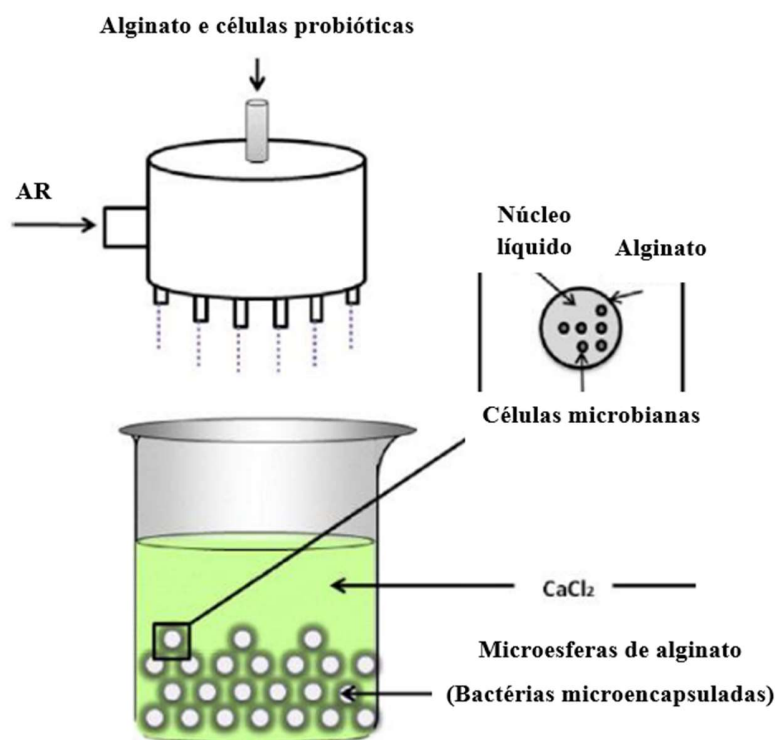
2.2.2 Gelificação iônica externa

O encapsulamento é um método utilizado para ampliar a viabilidade das cepas probióticas no trato gastrointestinal e para proteger os probióticos durante o processamento e armazenamento quando adicionadas em alimentos. Vários métodos de encapsulamento utilizados para bactérias probióticas geralmente envolvem o sequestro em grânulos de hidrocoloide, conhecido como método de gelificação iônica. Este método é fundamentado na capacidade de polímeros iônicos, como alginato, de sofrer reticulação por interação eletrostática entre espécies com carga contrária para formar partículas de hidrogel (SOHAIL *et al.*, 2013). Esta técnica de encapsulação é dividida em dois grupos: extrusão e emulsão, também chamada de técnicas de gelificação iônica externa e gelificação iônica interna, respectivamente (CHUN; KIM; CHO, 2014, KRASAEKOOP; BHANDARI; DEETH, 2003).

O material de parede mais utilizado na técnica de gelificação iônica externa de probióticos é o alginato, um polímero de resíduos de ácido manurônico e gulurônico, devido a sua capacidade de gelificação ionotrópica (CHUN; KIM; CHO, 2014; DONG *et al.*, 2013; ZOU *et al.*, 2012). O alginato de sódio é um polímero polieletrólito que em solução aquosa apresenta forma iônica, resíduos de ácido carboxílico ionizam e passam a ter carga negativa. O processo de gelificação do alginato, pode ser estimulada pela ligação cruzada das unidades de ácido gulurônico com cátions di ou polivalentes, como o cálcio (YANG *et al.*, 2015).

Na técnica de extrusão, uma solução do polímero é misturada com as cepas e, em seguida, extrudida através de um orifício como gotículas na solução de um agente de reticulação. A gelificação iônica externa acontece pelo toque da solução de polímero (alginato de sódio) com o agente de reticulação, normalmente uma solução de cloreto de cálcio (BRUN-GRAEPPPI *et al.*, 2011; RATHORE *et al.*, 2011) (FIGURA 4). A gelificação iônica externa é um processo contínuo e tem uma grande capacidade de produção (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016; YANG *et al.*, 2015) de microesferas probióticas e resultados satisfatórios. As variáveis que afetam o diâmetro das microesferas produzidas incluem o tamanho do bico, a concentração das soluções de polímero e reticulante, a viscosidade e a taxa de fluxo da solução de polímero e a distância do orifício para a solução de reticulação (BRUN-GRAEPPPI *et al.*, 2011). Os maiores benefícios do uso do método de extrusão são a simplicidade de operação, menor custo e condições operacionais amenas assegurando boa viabilidade celular (BURGAIN *et al.*, 2011; DE VOS *et al.*, 2010).

Figura 4 - Representação esquemática do procedimento de extrusão.



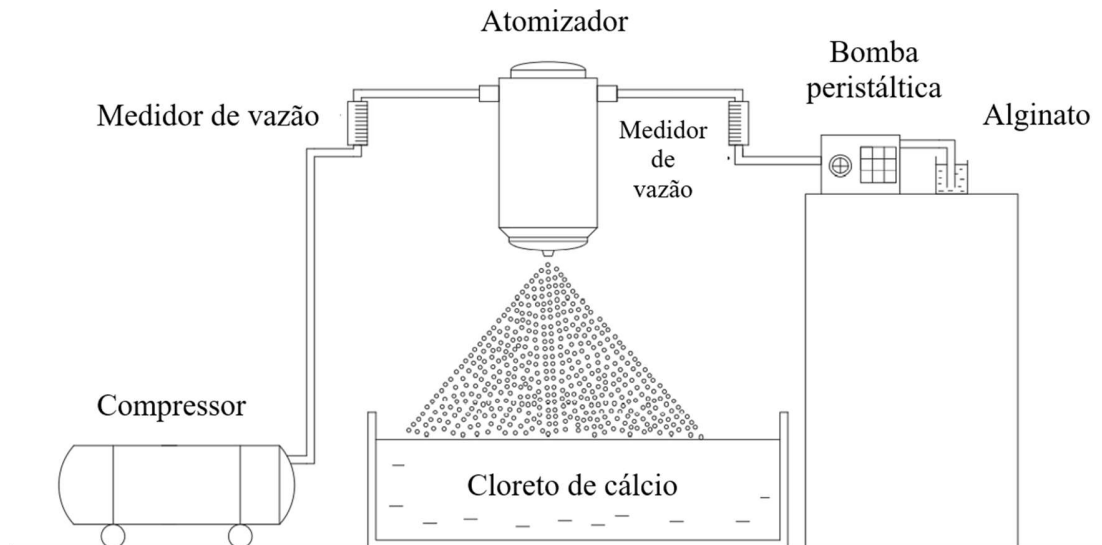
Fonte: Adaptado de Burgain *et al.* (2011).

2.2.3 Atomização

As microesferas também podem ser desenvolvidas por sistema de vibração ou método de atomização de ar. Gotículas menores podem ser desenvolvidas usando um sistema de vibração ou método de atomização de ar para extrudar a solução de polieletrólito. O último envolve um atomizador de ar (FIGURA 5) (PATIL *et al.*, 2010).

O ar pressurizado é alimentado para se homogeneizar com a solução do polieletrólito, obrigando a saída de gotas pequenas pelo orifício do bico. Quando o material de parede (polímero) entra em contato com os cátions eles reticulam para formar gotículas de microgel (PATIL *et al.*, 2010).

Figura 5 – Produção de microesferas de alginato de sódio por atomização.



Fonte: Adaptado de Chan *et al.* (2012).

2.3 Doce de leite

De acordo com a Portaria nº 354, de 04 de setembro de 1997, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que preconiza o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Doce de Leite, define como Doce de Leite “o produto, com ou sem adição de outras substâncias alimentícias, obtido por concentração e ação do calor a pressão normal ou reduzida do leite ou leite em pó, com ou sem adição de sólidos de origem láctea adicionado de sacarose”. De acordo com a mesma Portaria, são permitidos o uso de ingredientes opcionais como monossacarídeos e dissacarídeos que substitua a sacarose em no máximo de 40% m/m e outros ingredientes e/ou outros produtos alimentícios em proporção entre 5% e 30% m/m do produto final (BRASIL, 1997).

O doce de leite é mais produzido, vendido e consumido na Argentina, Uruguai e Brasil, e exportado para a União Europeia e os Estados Unidos (RANALLI; ANDRÉS; CALIFANO, 2017a). Nos anos de 2017 e 2018, a produção do doce de leite no Brasil foi próxima a 82624 e 74955 toneladas, respectivamente (GOMES *et al.*, 2020). No primeiro semestre de 2016, o estado de Minas Gerais exportou mais de US\$ 106 mil em doce de leite para países como os Estados Unidos, Reino Unido, Angola e Bolívia. Atualmente, Minas Gerais é o estado que mais exporta doce de leite seguido por São Paulo, com US\$ 27 mil e Santa Catarina, com US\$ 13 mil. Em 2014, as exportações de doce de leite do Brasil foram equivalentes a US\$ 239 mil. Em 2016, foi

observado um aumento de 82% nas importações de doce de leite quando comparado com o ano anterior. A Argentina é o principal país do qual o Brasil compra doce de leite (COMEX STAT, 2020; VARGAS *et al.*, 2021).

Segundo o país onde é produzido e comercializado, o doce de leite apresenta qualificações diferentes e eles podem ter diferenças em sua composição ou processo de produção. O Mercado Comum do Sul (MERCOSUL) define a lei, características, classificação e os requisitos de qualidade para doces de leite comercializados em seus países membros. O Brasil tem legislação própria em consonância com as determinações do Mercosul (BRASIL, 1997; MERCOSUL, 1996; VARGAS *et al.*, 2021).

Observando os requisitos de qualidade descritos na Portaria nº 354 do MAPA, os doces de leite devem apresentar características sensoriais peculiares, como: consistência cremosa ou pastosa, ausência de cristais perceptíveis sensorialmente; cor castanho caramelado proveniente da reação de Maillard e; sabor e odor característicos, sem sabores e odores estranhos. Com relação ao acondicionamento e armazenamento do doce de leite, a Portaria estabelece que deverá ser envasado com materiais adequados e que confirmam uma proteção apropriada contra a contaminação (BRASIL, 1997). Na Tabela 1 estão descritos os requisitos físico-químicos, bem como os limites estabelecidos.

Tabela 1 - Requisitos físico-químicos do doce de leite estabelecidos pela Portaria nº 354, de 04 de setembro de 1997, do MAPA (BRASIL, 1997).

Requisito	(g/100 g)
Umidade	Máximo de 30,0
Matéria gorda	6,0 a 9,0
Cinzas	Máximo de 2,0
Proteína	Mínimo de 5,0

Fonte: Brasil (1997).

O doce de leite é um produto lácteo conservado por concentração de sólidos e adição de açúcar. Em função do processamento é criado um ambiente de alta pressão osmótica, possibilitando sua conservação em temperatura ambiente (MADRONA *et al.*, 2009).

O principal ingrediente utilizado na formulação de doce de leite é o leite e uma boa qualidade é imprescindível para sua utilização no processo de produção. O leite de qualidade

inferior tende a apresentar maior acidez (causado por microrganismos) e presença de enzimas termoestáveis que podem desequilibrar a composição dos componentes do leite. Outros requisitos como estabilidade ao calor e altos teores de sólidos (a gordura está relacionada com a textura do doce), são indispensáveis para a obtenção de um produto de qualidade (VARGAS *et al.*, 2021).

A sacarose é um glicídio composto por uma unidade de glicose ligada a uma de frutose unida através de suas extremidades redutoras. Por não ter uma extremidade redutora ela é classificada como açúcar não redutor e não participa da reação de Maillard (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2018). A sacarose gera sabor, textura e sua presença aumenta a pressão osmótica e reduz a atividade de água do meio. As vantagens de sua utilização é o seu baixo custo, disponibilidade e alta solubilidade, fatores que conferem boa viscosidade ao produto final (PERRONE *et al.*, 2011).

No leite e produtos derivados é comum o desenvolvimento da reação de Maillard, a partir de tratamentos térmicos empregados no processamento. A reação de Maillard acontece entre o carbono anomérico da unidade de glicose da lactose que está disponível para oxidação e grupos amina – RNH_2 , com eliminação de água e formação de glicosaminas. Ocorrem diversas etapas (rearranjo de Amadori, enolização, formação de bases de Schiff, formação de 5-hidroxiacetilfurfural - HMF), que irão polimerizar e resultarão no aparecimento de compostos chamados melanoidinas (DA SILVA, 1997).

A reação de Maillard contribui na formação do *flavor* agradável, aroma e coloração (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2018). Em condições específicas podem formar coloração e *flavor* indesejáveis e alterar a qualidade do alimento durante o processamento e armazenamento. Essas reações em produtos lácteos provocam perdas significantes de lisina, diminuição da digestibilidade de proteínas e redução do valor nutritivo. O doce de leite convencional, elaborado sem a adição de outros ingredientes e/ou outros produtos alimentícios, é constituído basicamente de leite concentrado adicionado de açúcar. Observa-se na Tabela 2 que o doce de leite apresenta elevado valor nutricional e conteúdo energético. É um alimento menos perecível que o leite e de grande aceitação sensorial (SANTOS; GOULART; RAMOS, 2012).

Tabela 2 – Tabela nutricional do doce de leite.

Constituintes	Doce de leite (100 g)
Calorias (Kcal)	322
Umidade (g)	26,6
Proteína (g)	8,3
Lipídeos (g)	8,3
Lactose (g)	10,2
Outros açúcares (g)	45,3
Cinzas (mg)	1,4
Cálcio (mg)	280
Fósforo (mg)	220
Ferro (mg)	0,20

Fonte: Martins e Lopes (1981).

O padrão microbiológico para doce de leite inclui *Staphylococcus coagulase* positiva, Contagem de fungos e leveduras (BRASIL, 1997; MERCOSUL, 1996) e em adição, Coliformes totais e *Salmonella* sp. de acordo com o padrão preconizado pela Resolução n° 331, de 23 de dezembro de 2019 (ANVISA, 2019). A Tabela 3 apresenta os padrões microbiológicos para o doce de leite estabelecidos pela Portaria n° 354, de 04 de setembro de 1997, do MAPA (BRASIL, 1997), e pela RDC n° 331, de 23 de dezembro de 2019 (ANVISA, 2019).

Tabela 3 - Padrões microbiológicos do doce de leite estabelecidos para o doce de leite (ANVISA, 2019; BRASIL, 1997).

Padrões microbiológicos	<i>Staphylococcus coagulase</i> positiva (UFC/g)	Fungos e leveduras (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	<i>Salmonella</i> sp. (UFC/g)
Máx. permitido	1 x 10 ²	1 x 10 ²	5 x 10 ¹	Ausência

Fonte: Anvisa (2019) e Brasil (1997).

2.4 Desenvolvimento de doce de leite funcional

A fim de atender às novas demandas do mercado que deseja produtos com qualidade sensorial e nutricional associada a benefícios para a saúde, as indústrias estão buscando novos ingredientes para o uso no processamento (MOSCATTO; PRUDÊNCIO-FERREIRA; HAULY, 2004). Substitutos do açúcar e da gordura são utilizados nas formulações como alternativas mais saudáveis, destinadas para dietas com restrição de açúcares ou para reduzir o valor calórico do produto.

Segundo a RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012, um produto para ser considerado “reduzido em” ou “light” deve apresentar uma redução mínima de 25% nos conteúdos de açúcares, ou de gorduras totais ou no valor energético em relação ao produto convencional (ANVISA, 2012). Já os alimentos “sem adição de açúcares” ou “diet” devem ser formulados sem a adição de açúcares, sendo permitida a presença dos açúcares naturalmente existentes nas matérias-primas utilizadas.

O doce de leite é um produto elaborado com formulação rica em açúcar e gordura que vai contra as tendências atuais do mercado por produtos mais saudáveis causando inevitavelmente a desvalorização do produto. A indústria de alimentos vem investindo cada vez mais no desenvolvimento de produtos diferenciados com características especiais, como os produtos das linhas *light*, *diet* e funcionais, para atender a demanda e manter as características dos produtos convencionais (GUIMARÃES *et al.*, 2012). Dessa forma, tratando-se de um produto com grande potencial para melhorias (GUIMARÃES *et al.*, 2012), fazem-se necessários novos estudos que pretendam elaborar novas formulações com ingredientes diferenciados para conquistar uma variedade maior de consumidores.

A utilização de novos ingredientes nas formulações de doces de leite como frutas pouco consumidas, ingredientes que substituem o açúcar e a gordura, o uso de soro de leite, ou o uso de leite de outros animais, apresentam formas convenientes e interessantes de diversificação do produto. Vários estudos relevantes enfocam a diversificação de doces de leite, mas é preciso prestar atenção à legislação vigente, principalmente se houver o interesse na introdução de um novo produto no mercado. Estudos devem cumprir a legislação e atender as exigências estabelecidas no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Doce de Leite, principalmente para evitar a descaracterização do produto (MERCOSUL, 1996; VARGAS *et al.*, 2021).

No estudo do efeito do tempo de armazenamento nas características do doce de leite com café, Rocha *et al.* (2017) obtiveram um produto *light* com redução de gordura, utilizando 55% de leite e substituindo em 45% do leite por soro e verificaram que o tempo de armazenamento exerceu efeito significativo nos parâmetros de textura instrumental dos doces: dureza, adesividade, elasticidade, coesividade e gomosidade, bem como nas variáveis de cor b^* e L^* . Não foram observadas formações de cristais de lactose e a qualidade microbiológica foi mantida durante todo o período de 180 dias. Na análise sensorial, observaram que o tempo não influenciou na aceitação do doce em relação ao sabor, textura e impressão global, mostrando que os efeitos significativos encontrados para os parâmetros instrumentais de textura e cor não comprometeram a qualidade sensorial do produto.

Cardoso *et al.* (2018) produziram doce de leite com leite de búfala e verificaram o efeito da substituição parcial da sacarose pela oligofrutose, nas propriedades físico-químicas, de cor e de textura do doce. Os resultados obtidos mostraram que a utilização da oligofrutose não influenciou no teor de sólidos solúveis totais, acidez, umidade, atividade de água e sais minerais determinados no doce e os valores do pH foram maiores para o doce com oligofrutose. O uso da oligofrutose contribuiu para a obtenção de um doce de leite mais escuro, mais firme e mais adesivo.

Ranalli, Andrés e Califano (2017b) desenvolveram formulações com baixo teor de gordura utilizando o leite desnatado, goma xantana e diferentes teores de umidade, seguindo o método tradicional de produção do doce de leite. Os autores observaram que os conteúdos de água e goma xantana eram de 35,4% e 0,18%, respectivamente, a combinação que se comportaria de forma mais similar ao doce de leite regular (sem redução de gordura). Concluíram que a diminuição da água disponível no produto aumentou a viscosidade e o fluxo de cisalhamento do doce de leite. Com a metodologia proposta foi possível escolher a melhor combinação para obter um doce de leite com baixo teor de gordura com características reológicas semelhantes a uma marca comercial *Premium*.

Milagres *et al.* (2010) produziram duas formulações de doce de leite com substituição da sacarose por sucralose e ciclamato e outra por sacarina e sorbitol, ambas com adição de carragena. Não foram encontradas diferenças significativas no teor de acidez, os doces sem adição de açúcares apresentaram maiores teores de gordura em comparação ao controle (produzido com sacarose) e menor textura e sólidos solúveis. Segundo os autores, o doce de leite com sucralose mostrou-se uma boa alternativa para substituição do doce de leite com sacarose, uma vez que obteve boa aceitação na análise sensorial para o atributo sabor.

Guimarães *et al.* (2012) desenvolveram formulações de doce de leite com café com diferentes níveis de polidextrose e sucralose, com baixo teor calórico e propriedades funcionais. Nas formulações com maiores níveis de sucralose e polidextrose observou-se o aumento do teor de resíduo mineral fixo, ácidos e fibras. Maior rendimento foi alcançado com maiores concentrações de polidextrose e menor substituição da sacarose pela sucralose. Foi observado que a presença de sucralose e polidextrose não influenciaram significativamente nas características tecnológicas desejáveis do doce de leite, mas melhoraram a qualidade nutricional do produto.

2.4.1 Sucralose

A sucralose (1,6-dicloro-1,6-didesoxi- β -D-frutofuranosil-4-cloro-4-desoxi- α -D-galactopiranosídeo) é obtida a partir da sacarose em um processo de cinco etapas, que substitui três grupos hidroxila por três moléculas de cloro, produzindo uma substância bastante estável. Apesar da presença de três átomos de cloro, a sucralose é um composto hidrofílico com considerável solubilidade em água 283 g/L (20 °C). Apresenta alta intensidade de doçura (aproximadamente 600 vezes em comparação com a sacarose) e não calórica. Estudos em animais e humanos concluíram que a sucralose é segura para o consumo humano. Sua natureza atóxica, não cancerígena e não biorreativa permitiu a aprovação de seu uso em vários países. Em estudos com humanos, 90% da dose oral passa pelo organismo sem alterações em sua forma original (GRICE; GOLDSMITH, 2000).

A Resolução RDC nº 18, de 24 de março de 2008, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008), que dispõe sobre o Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos, estabelece para o uso da sucralose quantidades máximas de 0,04 g/100 g ou g/100 mL para alimentos para controle de peso, alimentos para dietas com ingestão controlada de açúcares e alimentos para dietas com restrição de açúcares. O Codex Alimentarius (2008) permite o uso de sucralose em um limite máximo de 250 ppm (0,025 g/100 g) para sobremesas e doces com base láctea.

A sucralose exerce efeitos importantes sobre as características sensoriais, físicas, microbianas e químicas dos produtos. Modificações no sabor, cor, viscosidade, cristalização, conservação e caramelização são descritas por Brands e Van Boekel (2001), além de apresentar propriedades tecnológicas favoráveis para confecção de doces pastosos como alta estabilidade

térmica, solubilidade em meio aquoso e ausência de sabor residual amargo ou metálico (GUIMARÃES *et al.*, 2012).

2.4.2 Café

Dados epidemiológicos e pesquisas experimentais sugerem que o consumo de café está associado a um risco reduzido de várias doenças crônicas, degenerativas ou não (NIEBER, 2017): doenças cardiovasculares (DING *et al.*, 2014); desenvolvimento de diabetes tipo 2 (FLOEGEL *et al.*, 2012); doença hepática crônica (SHIM *et al.*, 2013); colite ulcerativa (NG *et al.*, 2014); câncer de cólon (WOOLCOTT; KING; MARRETT, 2002); câncer endometrial (GUNTER *et al.*, 2012); morte por câncer de boca/faringe (HILDEBRAND *et al.*, 2013); Mal de *Parkinson* (ASCHERIO *et al.*, 2001) e; litíase vesical (LEITZMANN *et al.*, 1999).

As bebidas de café contêm quantidades consideráveis de galactomananos e arabinogalactanos tipo II que pertencem ao complexo da fibra alimentar, que inclui polissacarídeos, oligossacarídeos, lignina e substâncias vegetais associadas que não são degradadas pelas enzimas digestivas humanas. Assim, eles atingem o cólon e potencialmente servem como substratos para a microbiota intestinal (GNIECHWITZ *et al.*, 2007). Esses polissacarídeos estão presentes em quantidades que variam de 5,0 a 22 g/100 g e de 8,5 a 14 g/100 g no grão cru e torrado de café arábica, respectivamente (BRADBURY; HALLIDAY, 1990). A torração dos grãos provoca perdas significantes nos teores desses polissacarídeos que podem sofrer diminuições médias de 28,5%, sendo a arabinogalactanas tipo II a mais sensível (OOSTERVELD; VORAGEN; SCHOLS, 2003). Gniechwitz *et al.* (2007) quantificaram em uma xícara de café (150 mL), preparada com teor médio de 1,6% de pó, teores médios de 0,5 g de fibra alimentar solúvel.

A Organização Mundial da Saúde sugere a ingestão diária de 27 a 40 g de fibra alimentar, a agência reguladora americana *Food and Drug Administration* recomenda aos adultos o consumo de 25 g por 2.000 Kcal/dia e a *American Health Foundation* recomenda a ingestão mínima de fibra igual a 5 g mais a idade em anos (idade + 5 g). No Brasil, a Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição recomenda a adultos jovens a ingestão diária de 20 g. A quantidade de fibra alimentar solúvel é recomendada pela *American Diabetess Association* que corresponde a 25% do total de 20 a 35 g de fibra alimentar consumidas diariamente (DE FIGUEIREDO *et al.*, 2009).

A ingestão de quantidades adequadas de fibra alimentar está relacionada a diversos efeitos fisiológicos e metabólicos, como a redução do colesterol sanguíneo (DELANEY *et al.*, 2003). Além disso, os polissacarídeos fermentáveis são degradados pela microbiota intestinal em ácidos graxos de cadeia curta, principalmente acetato, propionato e butirato, bem como gases como H₂, CH₄ e CO₂. A produção desses ácidos graxos diminui o pH do cólon, impede o crescimento de bactérias patogênicas e estimulam o crescimento de bactérias lácticas benéficas para a saúde humana (SAAD, 2006; GNIECHWITZ *et al.*, 2007).

O café apresenta uma composição rica e complexa em compostos bioativos, pertencentes aos mais diversos grupos funcionais químicos. As diversidades desses compostos no café se devem às diferentes espécies, variedades, tipos de torração e de processamento dos grãos. Na torração, os grãos crus de café são submetidos a altas temperaturas e acontecem diversas reações químicas, como as reações de *Maillard*, que originam vários componentes exclusivos. Além disso, o café é abundante em polifenóis como os da classe dos ácidos clorogênicos (cafeoilquínicos, ferulilquínicos e dicafoilquínicos) (CLIFFORD, 2000). Os metabólitos fenólicos dos ácidos clorogênicos têm sido amplamente estudados no café devido ao seu grande potencial de bioeficácia (GEORGE; RAMALAKSHMI; RAO, 2008) e alguns estudos já investigaram a biodisponibilidade desses metabólitos nas complexas vias do metabolismo humano. As lactonas, diterpenos (incluindo o cafestol e o kahweol), niacina e a trigonelina, precursora da vitamina B3, também estão presentes na bebida (LIANG; KITTS, 2014), o cafestol e o kahweol mostraram atividade antioxidante em modelos celulares e modelos de camundongos que envolviam o desencadeamento da supra regulação de enzimas antioxidantes (NIEBER, 2017).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O doce de leite é um produto que conquistou o mercado por apresentar textura lisa, macia e sabor legítimo, agradável e muitas vezes afetivo. A adição do café como ingrediente do doce de leite é vista como uma forma de proporcionar ao doce de leite um sabor agradável, diferenciado, menos adocicado e mais saboroso.

Buscando atender às exigências dos consumidores por alimentos mais saudáveis, com teores de açúcares e de gorduras reduzidos, o desenvolvimento de doces de leite com a substituição parcial da sacarose por sucralose e a utilização do leite semidesnatado apresentam-se como alternativa viável de produzir doces de leite mais saudáveis e com valores calóricos reduzidos. A utilização do café solúvel na formulação dos doces pode ainda trazer benefícios com relação aos altos teores de fibra solúvel e de compostos bioativos, conhecidos por diminuir os riscos de desenvolver várias doenças.

A busca por uma alimentação saudável reflete em vários segmentos do mercado e a grande aceitação dos produtos alimentícios contendo probióticos, introduzidos na categoria de alimentos funcionais, são os grandes responsáveis pela alta lucratividade do setor. A utilização de cepas probióticas em alimentos apresenta uma grande demanda do mercado e a estratégia de utilizar “novos alimentos” para a entrega de probióticos vivos e viáveis pode apresentar uma possibilidade palpável desde que, os mesmos alimentos possuam características físico-químicas e estabilidade necessárias para essa entrega e, ao mesmo tempo, os probióticos consigam sobreviver durante o armazenamento do produto, processamento e a passagem pelo trato gastrointestinal.

A microencapsulação por gelificação iônica externa utilizando o alginato como polímero e o agente reticulador cloreto de cálcio é utilizada para manter a viabilidade de cepas probióticas durante o armazenamento de produtos e durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Esse método produz microesferas pelas estruturas de blocos GG presentes no polímero e a interação iônica com íons cálcio formando o modelo “caixa de ovo” e, conseqüentemente, aprisionando as cepas dentro da matriz polimérica. Essa técnica aliada à atomização, utilizando o bico duplo fluído do equipamento Spray Dryer, sem a aplicação adicional de técnicas de secagem, pode ser utilizada para produzir microesferas gelatinosas, de tamanhos desejáveis e compatíveis com as características físicas do doce de leite com café, sem prováveis prejuízos para a sua aceitação sensorial.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n.º 331, de 23 de dezembro de 2019. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos e sua aplicação. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 26 dez. 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n.º 54, de 12 de novembro de 2012. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre informação nutricional complementar. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 12 nov. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n.º 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 03 maio 1999.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n.º 241, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 27 jul. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n.º 18, de 24 de março de 2008. Dispõe o Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 25 mar. 2018.

ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**, [London], v. 18, n. 5, p. 340-351, May 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224407000350>. Acesso em: 01 set. 2021.

ANDRIAMANANTOANINA, H.; RINAUDO, M. Relationship between the molecular structure of alginates and their gelation in acidic conditions. **Polymer International**, [Chichester], v. 59, n. 11, p. 1531–1541, Nov. 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pi.2943>. Acesso em: 22 fev. 2021.

ARAGON-ALEGRO, L. C. *et al.* Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT - Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 40, n. 4, p. 669–675, May 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S002364380600051X>. Acesso em: 25 jan. 2021.

ASAD, S.; OPAL, S. M. Bench-to-bedside review: quorum sensing and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection. **Critical Care**, [Amsterdam], v. 12, n. 6, p. 236, Nov. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19040778/>. Acesso em: 10 set. 2021.

ASCHERIO, A. *et al.* Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. **Annals of Neurology**, [Boston], v. 50, n. 1, p. 56–63, July 2001. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ana.1052>. Acesso em: 04 jan. 2021.

AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. *In*: SALMINEN, S.; WRIGHT, A. V.; OUWEHAND, A. (eds.). **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 2004. p. 1-66.

BRADBURY, A. G. W.; HALLIDAY, D. J. Chemical structures of green coffee bean polysaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [Washington], v. 38, n. 2, p. 389–392, Feb. 1990. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf00092a010>. Acesso em: 04 jan. 2021.

BRANDS, C. M. J.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. Reactions of monosaccharides during heating of sugar-casein Systems: buiding of a reaction networt model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [Washington], v. 49, n. 10, p. 4667-4675, Oct. 2001. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf001430b?src=recsys#>. Acesso em: 01 jun. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n.º 354, de 4 de setembro de 1997. Estabelece a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que deverá cumprir o doce de leite destinado ao consumo humano. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil: Poder Executivo**, Brasília, DF, 4 set. 1997.

BRUN-GRAEPP, A. K. A. S. *et al.* Cell microcarriers and microcapsules of stimuli-responsive polymers. **Journal of Controlled Release**, [Toronto], v. 149, n. 3, p. 209–224, Feb. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21035510/>. Acesso em: 10 out. 2021.

BURGAIN, J. *et al.* Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, [Oxford], v. 104, n. 4, p. 467–483, June 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S026087741000631X>. Acesso em: 04 out. 2021.

BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, [Caracas], v. 57, n. 4, p. 373-380, dic. 2007. Disponível em: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0004-06222007000400010&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 10 set. 2021.

CARDOSO, A. E. M. *et al.* Emprego de prebiótico em doce de leite bubalino visando à redução da sacarose. **Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**, [Pinhalzinho], v. 4, n. 1, p. 01–11, fev. 2018. Disponível em: <https://www.revistas.udesc.br/index.php/revistacsbea/article/view/13162/9497>. Acesso em: 04 out. 2021.

- CHAN, E-S. *et al.* The effect of low air-to-liquid mass flow rate ratios on the size, size distribution and shape of calcium alginate particles produced using the atomization method. **Journal of Food Engineering**, [Oxford], v. 108, n. 2, p. 297–303, Jan. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877411004365>. Acesso em: 22 dez. 2020.
- CHANDRAMOULI, V. *et al.* An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. **Journal of Microbiological Methods**, [Netherlands], v. 56, n. 1, p. 27–35, Jan. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14706748/>. Acesso em: 21 set. 2021.
- CHARTERIS, W. P. *et al.* Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **The International Journal of Dairy Technology**, [Long Hanborough], v. 51, n. 4, p. 123–136, Nov. 1998. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-0307.1998.tb02516.x>. Acesso em: 10 ago. 2021.
- CHEN, H-Y. *et al.* Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, [Amsterdam], v. 29, p. 248–255, Feb. 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1756464616304042>. Acesso em: 04 jan. 2021.
- 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**. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2007. p. 83–107.
- CHUN, H.; KIM, C-H.; CHO, Y-H. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* DKL 109 using external ionic gelation method. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, [Coreia], v. 34, n. 5, p. 692–699, Oct. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4662232/>. Acesso em: 12 out. 2021.
- CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science Food Agriculture**, [Amsterdam], v. 80, n. 7, p. 1033–1043, May 2000. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291097-0010%2820000515%2980%3A7%3C1033%3A%3AAID-JSFA595%3E3.0.CO%3B2-T>. Acesso em: 09 jun. 2021.
- CODEX ALIMENTARIUS. Report of the fortieth session of the Codex committee on food additives. **Joint FAO/WHO food standards programme Codex alimentarius commission**, 31st Session, [Switzerland], 2008. p. 1-166. Disponível em: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/resources/circular-letters/en/>. Acesso em: 21 jan. 2021.
- COMEX STAT. Exportação e importação geral. **Ministério da indústria, comércio exterior e serviços**. Governo Federal, 2020. Disponível em: <http://comexstat.md ic.gov.br/pt/geral>. Acesso em: 25 de nov. 2021.

COMUNIAN, T. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. **Food Hydrocolloids**, [Oxford], v. 61, p. 442–457, Dec. 2016. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X16302521>. Acesso em: 10 out. 2017.

COOK, M. T. *et al.* Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, [Toronto], v. 162, n. 1, p. 56-67, Aug. 2012. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168365912004968>. Acesso em: 12 nov. 2021.

CUI, J. H. *et al.* Survival and stability of *bifidobacteria* loaded in alginate poly-l-lysine microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, [Amsterdam], v. 210, n. 1-2, p. 51–59, Dec. 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11163987/>. Acesso em: 20 set. 2021.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018. 1120 p.

DA SILVA, P. H. F. Leite – Aspectos de Composição e Propriedades. **Química Nova na Escola**, Leite, [São Paulo], n. 6, p. 3-5, nov. 1997. Disponível em:

<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc06/quimsoc.pdf>. Acesso em: 04 out. 2021.

DA SILVA, T. M. *et al.* Development and characterization of microcapsules containing *Bifidobacterium* Bb-12 produced by complex coacervation followed by freeze drying. **LWT - Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 90, p. 412–417, Apr. 2008. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643817309519>. Acesso em: 10 nov. 2021.

DE FIGUEIREDO, S. M. *et al.* Fibras alimentares: combinações de alimentos para atingir meta de consumo de fibra solúvel/dia. **e-Scientia**, v. 2, n. 1, p. 1-18, dez. 2009. Disponível em:

https://www.repositorio.ufop.br/jspui/bitstream/123456789/4876/1/ARTIGO_Fibras%20AlimentaresCombination.pdf. Acesso em: 12 jan. 2021.

DELANEY, B. *et al.* Beta-glucan fractions from barley and oats are similarly antiatherogenic in hypercholesterolemic Syrian golden hamsters. **The Journal Nutrition**, [Houston], v. 133, n. 2, p. 468-475, Feb. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12566485/>. Acesso em: 02 jan. 2021.

DE VOS, P. *et al.* Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, [Wageningen], v. 20, n. 4, p. 292–302, Apr. 2010. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694609002167>. Acesso em: 04 set. 2021.

DING, M. *et al.* Long-term coffee consumption and risk of cardiovascular disease: a systematic review and a dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. **Circulation**, [Filadélfia], v. 129, n. 6, p. 643–659, Feb. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24201300/>. Acesso em: 02 jan. 2021.

DING, W. K.; SHAH, N. P. An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. **Journal of Food Science**, [Malden], v. 74, n. 2, Mar. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19323758/>. Acesso em: 21 set. 2021.

DONG, Q-Y. *et al.* Alginate-based and protein-based materials for probiotics encapsulation: A review. **International Journal Food Science and Technology**, [Oxford], v. 48, n. 7, p. 1339-1351, July 2013. Disponível em: <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijfs.12078>. Acesso em: 02 out. 2021.

DOWARAH, R.; VERMA, A. K.; AGARWAL, N. The use of *Lactobacillus* as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: A review. **Animal Nutrition**, [Pequim], v. 3, n. 1, p. 1–6, Nov. 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/310433823_The_use_of_Lactobacillus_as_an_alternative_of_antibiotic_growth_promoters_in_pigs_A_review. Acesso em: 22 nov. 2021.

FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, 2002. **Report of a joint FAO/WHO working group**. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002. p. 1–11. Disponível em: https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf. Acesso em: 12 nov. 2021.

FLESCH, A. G. T.; POZIOMYCK, A. K.; DAMIN, D. de C. O uso terapêutico dos simbióticos. **Revista ABCD: Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, [São Paulo], v. 27, n. 3, p. 206-209, jul./set. 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abcd/a/5v4WYfwB8dJV93b8pMZvZ5C/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 01 nov. 2021.

FLOEGEL, A. *et al.* Coffee consumption and risk of chronic disease in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Germany study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [Cambridge], v. 95, n. 4, p. 901–908, Apr. 2012. Disponível em: https://cancerres.unboundmedicine.com/medline/citation/22338038/Coffee_consumption_and_risk_of_chronic_disease_in_the_European_Pro prospective_Investigation_into_Cancer_and_Nutrition_EPIC_Germany_study_. Acesso em: 01 jan. 2021.

GANGULY, A. *et al.* Freeze-drying simulation framework coupling product attributes and equipment capability: Toward accelerating process by equipment modifications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [Heidelberg], v. 85, n. 2, p. 223–235, Oct. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23748132/>. Acesso em: 01 out. 2021.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. **Journal of Controlled Release**, [Toronto], v. 114, n. 1, p. 1–14, Aug. 2006. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016836590600201X>. Acesso em: 07 set. 2021.

GEORGE, S. E.; RAMALAKSHMI, K.; RAO, L. J. M. A perception on health benefits of coffee. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [Abingdon], v. 48, n. 8, p. 464–486, May 2008. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/5387659_A_Perception_on_Health_Benefits_of_Coffee. Acesso em: 27 jun. 2021.

GNIECHWITZ, D. *et al.* Dietary fiber from coffee beverage: Degradation by human fecal microbiota. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [Washington], v. 55, n. 17, p. 6989–6996, Aug. 2007. Disponível em:

<https://www.scirp.org/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=883872>. Acesso em: 03 jan. 2021.

GOMES, R. A. R. *et al.* O setor de produtos lácteos. **Brasil Dairy Trends 2020: Tendências do Mercado de Produtos Lácteos**. [Campinas], 2020. p. 11–46. Disponível em:

<http://www.brasildairyrends.com.br/48/>. Acesso em: 15 set. 2021.

GRICE, H. C.; GOLDSMITH, L. A. Sucralose--an overview of the toxicity data. **Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, [Amsterdam], v. 38, n. 2, p. 1–6, Jan. 2000. Disponível em:

<https://europepmc.org/article/MED/10882813>. Acesso em: 04 out. 2021.

GROBOILLOT, A. *et al.* Immobilization of cells for application in the food industry. **Critical Reviews in Biotechnology**, [Amsterdam], v. 14, n. 2, p. 75–107, Sept. 1994. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/07388559409086963>. Acesso em: 07 set. 2021.

GUIMARÃES, I. C. de O. *et al.* Development and description of light functional dulce de leche with coffee. **Ciência e Agrotecnologia**, [Lavras], v. 36, n. 2, p. 195–203, Apr. 2012. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/cagro/a/8VB6qxdYczz7TdLZ8phnK4P/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 01 jun. 2021.

GUNTER, M. J. *et al.* A prospective investigation of coffee drinking and endometrial cancer incidence. **International Journal of Cancer**, [Heidelberg], v. 131, n. 4, p. 530–536, Aug. 2012. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.26482>. Acesso em: 06 jan. 2021.

HANSEN, L. *et al.* Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium spp.* in milk and simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 19, n. 1, p. 35–45, Feb. 2002. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002001904526>. Acesso em: 01 out. 2021.

HAUG, A.; LARSEN, B.; SMIDSRØD, O. Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. **Acta Chemica Scandinavica**, [Escandinavica], v. 21, p. 691–704, Apr. 1967. Disponível em: <http://actachemscand.org/doi/10.3891/acta.chem.scand.21-0691>. Acesso em: 03 out. 2021.

HECHT, H.; SREBNIK, S. Structural characterization of sodium alginate and calcium alginate. **Biomacromolecules**, [Washington], v. 17, n. 6, p. 2160–2167, May 2016. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.biomac.6b00378>. Acesso em: 19 nov. 2021.

HEENAN, C. N. *et al.* Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. **LWT - Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 37, n. 4, p. 461–466, June 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643803002081>. Acesso em: 02 set. 2021.

HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [Amsterdam], v. 52, n. 4, p. 291–311, Apr. 2012. Disponível em: <https://europepmc.org/article/MED/22332594>. Acesso em: 4 set. 2021.

HILDEBRAND, J. S. *et al.* Coffee, tea, and fatal oral/pharyngeal cancer in a large prospective US cohort. **American Journal of Epidemiology**, [Oxford], v. 177, n. 1, p. 50–58, Jan. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23230042/>. Acesso em: 02 jan. 2021.

HILL, C. *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [Amsterdam], v. 11, p. 506–514, June 2014. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2014.66>. Acesso em: 12 nov. 2021.

HOLZAPFEL, W. H. *et al.* Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [Nova York], v. 73, n. 2, p. 365S–373S, Feb. 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11157343/>. Acesso em: 07 set. 2021.

HUIDROM, S.; BEG, M. A.; MASOOD, T. Post-menopausal Osteoporosis and Probiotics. **Current Drug Targets**, [Dubai], v. 22, n. 7, p. 816–822, Aug. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33109043/>. Acesso em: 11 nov. 2021.

JELEN, P.; LUTZ, S. Leite funcional e laticínios. **Em alimentos funcionais: Aspectos bioquímicos e de Processamento**. Lancaster: Technomic Publishing, 1998. p. 357–381. Disponível em: https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=O1jDyr1EkhEC&oi=fnd&pg=PR11&ots=55H9YapHgB&sig=IqCX6cw8zSQpZBVkCKsviTDHL7E&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false. Acesso em: 22 nov. 2021.

JEN, A. C.; WAKE, M. C.; MIKOS, A. G. Review: Hydrogels for cell immobilization. **Biotechnology and Bioengineering**, [Hoboken], v. 50, n. 4, p. 357–364, May 1996. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/%28SICI%291097-0290%2819960520%2950%3A4%3C357%3A%3AAID-BIT2%3E3.0.CO%3B2-K>. Acesso em: 01 set. 2021.

JOHN, R. P. *et al.* Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. **Critical Reviews in Biotechnology**, [Amsterdam], v. 31, n. 3, p. 211–226, Sept. 2011. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/07388551.2010.513327?journalCode=ibty20>. Acesso em: 22 set. 2021.

KAUR, I. P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [Amsterdam], v. 15, n. 1, p. 1-9, Mar. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11803126/>. Acesso em: 29 set. 2021.

KLAENHAMMER, T. R. *et al.* Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. **FEMS Microbiology Letters**, [Oxford], v. 29, n. 3, p. 393–409, Aug. 2005. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.fmre.2005.04.007>. Acesso em: 27 set. 2021.

KLAENHAMMER, T. R. Probiotics and prebiotics. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**, Washington, n. 2, p.797-811, 2001.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, [Amsterdam], v. 13, n. 1, p. 3-13, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694602001553>. Acesso em: 02 set. 2021.

LEITZMANN, M. F. *et al.* A prospective study of coffee consumption and the risk of symptomatic gallstone disease in men. **The Journal of the American Medical Association**, [Chicago], v. 281, n. 22, p. 2106-2112, June 1999. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/190309#:~:text=In%20this%20large%20prospective%20cohort,of%20decaffeinated%20coffee%20or%20tea>. Acesso em: 06 jan. 2021.

LIANG, N.; KITTS, D. D. Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. **Molecules**, [Basileian], v. 19, n. 11, p. 19180–19208, Nov. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25415479/>. Acesso em: 25 jan. 2021.

LIU, J.; COOK, B.; ROUX, S. The challenges in commercialisation of Probiotic API manufacturing. **Microbiology Australia**, [Melbourne], v. 41, n. 2, p. 82–85, May 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/341483632_The_challenges_in_commercialisation_of_Probiotic_API_manufacturing. Acesso em: 15 set. 2021.

- LUYER, M. D. *et al.* Strain-Specific effects of probiotics on gut barrier integrity following hemorrhagic shock. **Infection and Immunity**, [Davis], v. 73, n. 6, p. 3686–3692, June 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1111872/>. Acesso em: 10 nov. 2021.
- MADRONA, G. S. *et al.* Estudo do efeito da adição de soro de queijo na qualidade sensorial do doce de leite pastoso. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [Campinas], v. 29, n. 4, p. 826–833, out./dez. 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/QcXDzwG5NpFf5mKKrFTxG6g/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 04 jan. 2021.
- MARTINS, E. *et al.* Oil encapsulation techniques using alginate as encapsulating agent: Applications and drawbacks. **Journal of Microencapsulation**, [London], v. 34, n. 8, p. 754–771, Dec. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29161939/>. Acesso em: 17 out. 2021.
- MARTINS, J. F. P.; LOPES, C. N. Doce de leite: aspectos da tecnologia de fabricação. **Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n. 18, p. 1-37, 1981.
- MERCADO COMUM DO SUL. Grupo Mercado Comum. Regulamento Técnico Mercosul de identidade e qualidade do doce de leite. **Resolução Mercosul GMC n.º 137/96**, 1996. Disponível em: https://freitag.com.br/files/uploads/2018/02/portaria_norma_388.pdf. Acesso em: 29 nov. 2021.
- MILAGRES, M. P. *et al.* Análise físico-química e sensorial de doce de leite produzido sem adição de sacarose. **Revista Ceres**, [Viçosa], v. 57, n. 4, p. 439–445, jul./ago. 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/262634285_Physiochemical_and_sensorial_analyses_of_milk_fudge_prepared_without_sugar. Acesso em: 07 set. 2021.
- MINISTERIO DE GANADERÍA AGRICULTURA Y PESCA DEL URUGUAY. MGAP. **Estadísticas del sector lácteo 2018**. 2019. Disponível em: https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/2020-02/informe_final_2018.pdf. Acesso em: 02 set. 2020.
- MISRA, S.; PANDEY, P.; MISHRA, H. N. Novel approaches for co-encapsulation of probiotic bacteria with bioactive compounds, their health benefits and functional food product development: A review. **Trends in Food Science & Technology**, [London], v. 109, p. 340–351, Mar. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224421000406>. Acesso em: 11 nov. 2021.
- MIZOCK, B. A. Probiotics. **Disease-a-Month**, [Chicago], v. 61, n. 7, p. 259–290, Apr. 2015. Disponível em: <https://europepmc.org/article/MED/25921792>. Acesso em: 12 nov. 2021.

- MOSCATTO, J. A.; PRUDÊNCIO-FERREIRA, S. H.; HAULY, M. C. O. Farinha de yacon e inulina como ingredientes na formulação de bolo de chocolate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [Campinas], v. 24, n. 4, p. 634-640, out./dez. 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/hqr6dVQ7FvjzdwWgQfyBPKv/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 02 jan. 2021.
- NG, S. C. *et al.* Environmental risk factors in inflammatory bowel disease: a population-based case-control study in Asia-Pacific. **Gut**, [Nova Gales do Sul], v. 64, n. 7, p. 1063–1071, Sept. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25217388/>. Acesso em: 01 jan. 2021.
- NIEBER, K. The Impact of Coffee on Health Author Pharmacokinetics and Mode of Action Bioactive Components in Coffee. **Planta Medicine**, [Estugarda], v. 83, n. 1, p. 1256–1263, July 2017. Disponível em: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/pdf/10.1055/s-0043-115007.pdf>. Acesso em: 01 jan. 2021.
- NIVA, M. 'All foods affect health': Understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns. **Appetite**, [Amsterdam], v. 48, n. 3, p. 384–393, May. 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0195666306006349>. Acesso em: 15 out. 2021.
- OOSTERVELD, A.; VORAGEN, A. G. J.; SCHOLS, H. A. Effect of roasting on the carbohydrate composition of Coffea arabica beans. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 54, n. 2, p. 183–192, 2003. Disponível em: <https://research.wur.nl/en/publications/effect-of-roasting-on-the-carbohydrate-composition-of-coffee-arab>. Acesso em: 05 jan. 2021.
- OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: An overview of beneficial effects. **Antonie Van Leeuwenhoek**, [Berlim], v. 82, p. 279–289, Aug. 2002. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1020620607611>. Acesso em: 22 set. 2021.
- PARK, J.; FLOCH, M. H. Prebiotics, probiotics, and dietary fiber in gastrointestinal disease. **Gastroenterology Clinics of North America**, [Filadélfia], v. 36, n. 1, p. 47-63, Mar. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17472874/>. Acesso em: 15 nov. 2021.
- PATIL, J. S. *et al.* 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**, [Bucareste], v. 5, n. 1, p. 241–248, Mar. 2010. Disponível em: https://chalcogen.ro/241_Patil.pdf. Acesso em: 15 set. 2021.
- PEI-SHAN, H. *et al.* Multi-strain probiotic supplement attenuates streptozotocin-induced type-2 diabetes by reducing inflammation and β -cell death in rats. **PloS One**, [São Francisco], v. 16, n. 6, p.e0251646, June 2021. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0251646>. Acesso em: 10 nov. 2021.

PFEILER, E. A.; KLAENHAMMER, T. R. The genomics of lactic acid bacteria. **Trends in Microbiology**, [Vancouver], v. 15, n. 12, p. 546–553, Dec. 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0966842X07002053>. Acesso em: 12 set. 2021.

PICOT, A.; LACROIX, C. Encapsulation of *Bifidobacteria* in whey protein-based microcapsules and survival in stimulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal**, [Wageningen], v. 14, n. 6, p. 505–515, June 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694603002450>. Acesso em: 14 out. 2021.

RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 43, n. 1, p. 1–7, Jan. 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996909002749>. Acesso em: 07 set. 2021.

RANALLI, N.; ANDRÉS, S. C.; CALIFANO, A. N. Dulce de leche-like product enriched with emulsified pecan oil: Assessment of physicochemical characteristics, quality attributes, and shelf-life. **European Journal of Lipid Science and Technology**, [Greifswald], v. 119, n. 7, p. 1–10, Jan. 2017a. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejlt.201600377>. Acesso em: 04 jun. 2021.

RANALLI, N.; ANDRÉS, S. C.; CALIFANO, A. N. Rheological Behavior of Low-Fat Dulce De Leche with Added Xanthan Gum. **Journal of Food Processing and Preservation**, [Boston], v. 41, n. 4, p. 1–8, Aug. 2017b. Disponível em: [https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20183031366?q=\(au%3a%22Califano%2c+A.+N.%22\)](https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20183031366?q=(au%3a%22Califano%2c+A.+N.%22)). Acesso em: 04 jun. 2021.

RATHORE, S. *et al.* Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, [Oxford], v. 116, n. 2, p. 369–381, May 2013. Disponível em: <https://scholarbank.nus.edu.sg/handle/10635/106677>. Acesso em: 12 nov. 2021.

ROCHA, L. O. F. *et al.* Storage time effect on ‘Dulce de leche’ characteristics with coffee and whey. **Acta Scientiarum. Technology**, [Maringá], v. 39, n. 4, p. 503–510, Oct./Dec. 2017. Disponível em: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciTechnol/article/view/29396>. Acesso em: 02 jan. 2021.

ROWLEY, J. A.; MADLAMBAYAN, G.; MOONEY, D. J. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. **Biomaterials**, [Oxford], v. 20, n. 1, p. 45–53, Jan. 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9916770/>. Acesso em: 12 out. 2021.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [São Paulo], v. 42, n. 1, jan./mar. 2006. Disponível em: <https://docplayer.com.br/5436857-Probioticos-e-prebioticos-o-estado-da-arte.html>. Acesso em: 18 nov. 2021.

- SÁNCHEZ, B. *et al.* Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. **Molecular Nutrition & Food Research**, [London], v. 61, n. 1, p. 16-24, Jan. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27500859/>. Acesso em: 7 set. 2021.
- SANDERS, M. E. Probiotics: Considerations for human health. **Nutrition Reviews**, [Oxford], v. 61, n. 3, p. 91–99, Mar. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12723641/>. Acesso em: 27 set. 2021.
- 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 Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, [Juiz de Fora], v. 37, n. 388, p. 35–40, 2012. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/263>. Acesso em: 20 jun. 2021.
- SENUMA, Y. *et al.* Alginate hydrogel micro-spheres and microcapsules prepared by spinning disk atomization. **Biotechnology and Bioengineering**, [Franklin], v. 67, n. 5, p. 616–622, Mar. 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10649236/>. Acesso em: 02 out. 2021.
- SHAH, N. P.; LANKAPUTHRA, W. E. V. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt. **International Dairy Journal**, [Wageningen], v. 7, n. 5, p. 349–356, May. 1997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S095869469700023X>. Acesso em: 25 jan. 2021.
- SHERMAN, P. M.; OSSA, J. C.; JOHNSON-HENRY, K. Unraveling mechanisms of action of probiotics. **Nutrition in Clinic Practice**, [Dallas], v. 24, n. 10, p. 10–14, Feb./Mar. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19244144/>. Acesso em: 5 nov. 2021.
- SHIM, S. G. *et al.* Caffeine attenuates liver fibrosis via defective adhesion of hepatic stellate cells in cirrhotic model. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, [Hoboken], v. 28, p. 1877–1884, Dec. 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jgh.12317>. Acesso em: 2 jun. 2021.
- SIRÓ, I. *et al.* Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. **Appetite**, [Birmingham], v. 51, n. 3, p. 456–467, Nov. 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0195666308004923>. Acesso em: 26 nov. 2021.
- SOHAIL, A. *et al.* The viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM following double encapsulation in Alginate and Maltodextrin. **Food and Bioprocess Technology**, [Nova York], v. 6, p. 2763–2769, July 2003. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11947-012-0938-y>. Acesso em: 3 jan. 2021.
- SOUSA, S. *et al.* Characterization of freezing effect upon stability of, probiotic loaded, calcium-alginate microparticles. **Food and Bioprocess Processing**, [Londres], v. 93, p. 90–97, Jan. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960308513001259>. Acesso em: 07 set. 2021.

TEIXEIRA, M. A. **Influência da adição de biopolímeros e de diferentes técnicas de gotejamento na encapsulação de alfa-tocoferol por gelificação iônica.** 2021. 96 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Biomateriais) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2021.

TRUELSTRUPHANSEN, L. *et al.* Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium spp.* in milk and simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 19, n. 1, p. 35–45, Aug. 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002001904526>. Acesso em: 01 out. 2021.

TUOHY, K. M. *et al.* Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today**, [Amsterdam], v. 8, n. 15, p. 692-700, Aug. 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359644603027466>. Acesso em: 15 nov. 2021.

VARGAS, M. O. *et al.* Dulce de leche: Product types, production processes, quality aspects and innovations minor EDITS. **International Journal of Dairy Technology**, [Malden], v. 74, n. 2, p. 262–276, Jan. 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/toc/14710307/2021/74/2>. Acesso em: 10 out. 2021.

XIAO, Y. *et al.* Layer (whey protein isolate)-by-layer (xanthan gum) microencapsulation enhances survivability of *L. bulgaricus* and *L. paracasei* under simulated gastrointestinal juice and thermal conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, [Amsterdam], v. 148, p. 238-247, Apr. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31935402/>. Acesso em: 10 nov. 2021.

WOOLCOTT, C. G.; KING, W. D.; MARRETT, L. D. Coffee and tea consumption and cancers of the bladder, colon and rectum. **The European Journal of Cancer Prevention**, [Filadélfia], v. 11, n. 2, p. 137-145, Apr. 2002. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/45051243>. Acesso em: 02 fev. 2021.

YANG, J. *et al.* Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, [Oxford], v. 123, p. 53–66, June 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861715000533>. Acesso em: 12 jan. 2021.

ZOU, Q. *et al.* Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in whey protein-based microcapsules by transglutaminase-induced gelation. **Journal of Food Science**, [Chicago], v. 77, n. 5, p. 270-277, May 2012. Disponível em: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1750-3841.2012.02673.x>. Acesso em: 07 out. 2021.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 - CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE DE *LACTOBACILLUS PARACASEI* E *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* MICROENCAPSULADOS

Norma NBR 6022 (ABNT, 2018).

RESUMO

A microencapsulação é utilizada para proteção de bactérias e o uso da atomização pode favorecer a obtenção de microesferas com características compatíveis com as matrizes alimentares. O objetivo do trabalho foi produzir microesferas gelatinosas de alginato de cálcio contendo *L. paracasei* e *L. acidophilus* por gelificação iônica com atomização a ar pressurizado utilizando o bico do equipamento Spray Dryer com melhor eficiência de encapsulação, características morfológicas desejáveis, de tamanhos menores, melhor resistência térmica e melhor viabilidade em fluido gástrico e intestinal e ao armazenamento por 90 dias a 4 °C. Foram produzidas microesferas probióticas gelatinosas de *L. paracasei* e *L. acidophilus* com diâmetros ($p < 0,05$) de 101,12 μm e 100,74 μm , carregadas ($p < 0,05$) com 9,97 e 10,11 log UFC/g e eficiência de encapsulação ($p < 0,05$) de 95,95% e 93,15%, respectivamente. Na avaliação da resistência térmica, microesferas carregadas com probióticos apresentaram viabilidades preservadas em 6,21 e 7,11 log UFC/g após 20 minutos de exposição a 70 °C e a microencapsulação evitou perdas de 2,74 e 4,13 log UFC/g de *L. paracasei* e *L. acidophilus*, respectivamente, no mesmo tempo e temperatura. Em condições gastrointestinais simuladas perdas acumuladas nas viabilidades de *L. paracasei* livres e microencapsulados foram de 4,26 e 2,08 log UFC/g e de *L. acidophilus* livres e microencapsulados foram de 5,0 e 2,32 log UFC/g, respectivamente. No armazenamento por 90 dias as células microencapsuladas de *L. paracasei* diminuíram cerca de 15,36% enquanto as células microencapsuladas de *L. acidophilus* reduziram 26,69% (escala logarítmica) e a microencapsulação preservou as viabilidades em 7,82 e 6,48 log UFC/g, respectivamente. A técnica de microencapsulação utilizada preservou a viabilidade das bactérias em 10^6 a 10^7 e produziu microesferas com características desejáveis para aplicação em matrizes alimentares pastosas.

Palavras-chave: Condições gastrointestinais. Microscopia eletrônica de varredura. Armazenamento. Resistência térmica.

1 INTRODUÇÃO

O termo probióticos deriva da língua grega e significa “para a vida” e esses são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades apropriadas, conferem benefícios à saúde do indivíduo (ANVISA, 2018; HILL *et al.*, 2014).

Ao colonizar o trato gastrointestinal, as cepas probióticas corrigem o desequilíbrio da microbiota em decorrência de sua capacidade de interagir com as células epiteliais do intestino e impedir a aderência de patógenos entéricos, além de aumentar a produção de mucinas e de promover a produção de anticorpos IgA secretora que se liga aos patógenos. Também exercem efeito anti-inflamatório no intestino, impedindo a ativação de NFκB e IL-8. Os probióticos colonizadores também podem exercer um efeito antimicrobiano direto pela excreção de produtos como bacteriocinas que impedem o crescimento e a virulência de patógenos entéricos, aumentam as células de Paneth e os produtores de ácido lático também podem exercer um efeito antimicrobiano nos patógenos reduzindo o pH do intestino (MIZOCK, 2015).

Porém, a atividade ideal dessas bactérias quando utilizadas em matrizes alimentares dependerá de condições adequadas para o seu crescimento e metabolismo, de sua resistência às operações de processamento e estresses ambientais, interação com alimentos aos quais são adicionadas (SILVA *et al.*, 2018), de sua viabilidade celular durante a vida útil do produto, da presença em concentrações significativas e sua sobrevivência à acidez estomacal, enzimas hidrolíticas e sais biliares no intestino (AKIN; AKIN; KIRMACI, 2007; CHAMPAGNE *et al.*, 2011; COOK *et al.*, 2012; TERPOU *et al.*, 2019).

Estão sendo utilizadas várias técnicas para imobilizar culturas bacterianas, como a fixação de células a um substrato inerte, autoagregação por floculação, uso de agentes de reticulação e o aprisionamento ou encapsulação usando polímeros (DE ANDRADE *et al.*, 2019; JOHN *et al.*, 2011; KOURKOUTAS *et al.*, 2004; RATHORE *et al.*, 2013; REZAEI; GODINI; BAKHTOU, 2008; XIAO *et al.*, 2020).

O encapsulamento de culturas bacterianas envolve o revestimento ou aprisionamento de células dentro de um polímero para produzir esferas permeáveis a nutrientes, gases e metabólitos para manter a viabilidade celular dentro das esferas e também com a finalidade de isolamento, proteção e/ou liberação controlada em locais específicos do trato gastrointestinal (DING; SHAH, 2009; JOHN *et al.*, 2011; RATHORE *et al.*, 2013). Na colonização do intestino o uso da técnica

de encapsulação demonstraram ser cinco vezes mais eficientes que as cepas não encapsuladas (DEL PIANO *et al.*, 2011; MIZOCK, 2015).

Vários estudos mostraram que a microencapsulação de bactérias apresenta uma alternativa versátil, pois possibilita o uso de vários materiais e métodos de encapsulação (ANEKELLA; ORSAT, 2013; BOSNEA; MOSCHAKIS; BILIADERIS, 2014; LI *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2014; SOLANKI *et al.*, 2013; SOUSA *et al.*, 2015; YEUNG *et al.*, 2016), além de superar alguns inconvenientes encontrados com outras técnicas de imobilização celular (PARK; CHANG, 2000). A gelificação iônica externa é uma técnica simples de microencapsulação em que as microesferas são produzidas por pulverização de uma solução polimérica geralmente carregada negativamente em uma solução catiônica (SCHOUBBEN *et al.*, 2010), sem a utilização de solventes orgânicos, apresentando grande potencial para a aplicação em alimentos (PATIL *et al.*, 2010).

O alginato de sódio é um polissacarídeo linear não ramificado que, na presença de cátions polivalentes, como Ca^{2+} ou Al^{3+} , forma géis por reticulação polimérica (AHIRRAO *et al.*, 2014). Amplamente utilizado como material de parede para microencapsulação de probióticos, o alginato de sódio é um material considerado seguro pela Food and Drug Administration (GEORGE; ABRAHAM, 2006), biocompatível e barato. A facilidade de solubilizar o hidrogel e liberar células no intestino humano são benefícios adicionais (COOK *et al.*, 2012). Os cátions atuam como pontes entre as cadeias poliméricas aniônicas, constituindo ligações e formando uma rede de hidrogel. O Ca^{2+} é o material de parede mais utilizado, pois ele interage com os blocos G devido a sítios de quelação estruturalmente favoráveis (AHIRRAO *et al.*, 2014).

A obtenção de microesferas probióticas por meio da técnica de gelificação iônica por ar pressurizado utilizando o bico do equipamento Spray Dryer pode apresentar uma alternativa prática para a produção de microesferas, permitindo o controle mais efetivo e rápido da pressão e vazão de ar, facilidade de higienização do equipamento, desuso de temperaturas prejudiciais aos microrganismos e diminuição do tempo de duração do processo. Além disso, pode favorecer a obtenção de microesferas probióticas com características físicas compatíveis com as matrizes alimentares e com altas contagens para a adição em menores quantidades nos produtos, prevenindo alterações negativas nas características sensoriais.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi produzir e caracterizar microesferas de alginato contendo *L.paracasei* e *L. acidophilus* produzidas pelo método de gelificação iônica externa com atomização por ar pressurizado utilizando o bico pressurizado tipo *spray* duplo fluido

do equipamento Spray Dryer e avaliar a viabilidade das cepas microencapsuladas às condições gastrointestinais simuladas, à ação do calor e no armazenamento por 90 dias a 4 °C para posterior aplicação em matrizes alimentares pastosas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Culturas probióticas, ativação, padronização e propagação

Os microrganismos microencapsulados foram *Lactobacillus paracasei subsp paracasei* (LBC-81) (LBC) (Danisco Dupont, Cotia, São Paulo, Brasil) e *Lactobacillus acidophilus* (LA3) (LAC) (SACCO, Campinas, São Paulo, Brasil). 1 grama de cada bactéria foi suspenso em 10 mL de caldo MRS previamente esterilizado. Em seguida, foram mantidos a 37 °C por 48 horas (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960).

A padronização das culturas foi realizada por meio das curvas de crescimento. Após 48 horas de ativação iniciou-se a curva de crescimento para cada bactéria, em triplicata. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (Biospectro SP22, Curitiba, Brasil) com comprimento de onda de 600 nm, utilizando o caldo MRS estéril como branco. A determinação da viabilidade celular foi realizada por diluições decimais em série com água peptona 0,1% (p.v⁻¹) e plaqueamento em ágar MRS em placas de Petri. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas com enumeração dos microrganismos viáveis. A partir dos dados obtidos pelas curvas de crescimento, foram construídos gráficos entre absorbância e a contagem de colônias viáveis.

A propagação das bactérias foi realizada de acordo com os dados obtidos nas curvas de crescimento, onde foi possível determinar os valores de absorbâncias correspondentes a contagens entre 10¹⁰ e 10¹¹ UFC/mL para *L. acidophilus* e *L. paracasei*. Em tubos de ensaio contendo 9 mL de caldo MRS foram adicionados 1 mL da cultura estoque, que foram mantidos em estufa B.O.D a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, 10 mL de cada cultura ativa foram adicionados separadamente em 90 mL de caldo MRS estéril. Após 18 horas para *L. paracasei* e 16 horas para *L. acidophilus*, 100 mL da cultura crescida foram transferidos para erlenmeyers contendo 900 mL do caldo MRS e permaneceram a 37 °C até atingirem os valores de absorbâncias correspondentes aos números de células viáveis desejados, conforme as curvas de crescimento. Para separar o microrganismo do caldo MRS, as misturas foram transferidas para eppendorfs, previamente

esterilizados e centrifugados (5.000 rpm/5 min) a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os sedimentos celulares de *L. acidophilus* e *L. paracasei* foram lavados duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS: 10 mM KH₂PO₄ /K₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7). O sedimento celular obtido foi utilizado na microencapsulação e, para a realização dos experimentos de células livres, os probióticos foram cultivados nas mesmas condições e ressuspensos em água peptonada 0,1% (p.v⁻¹).

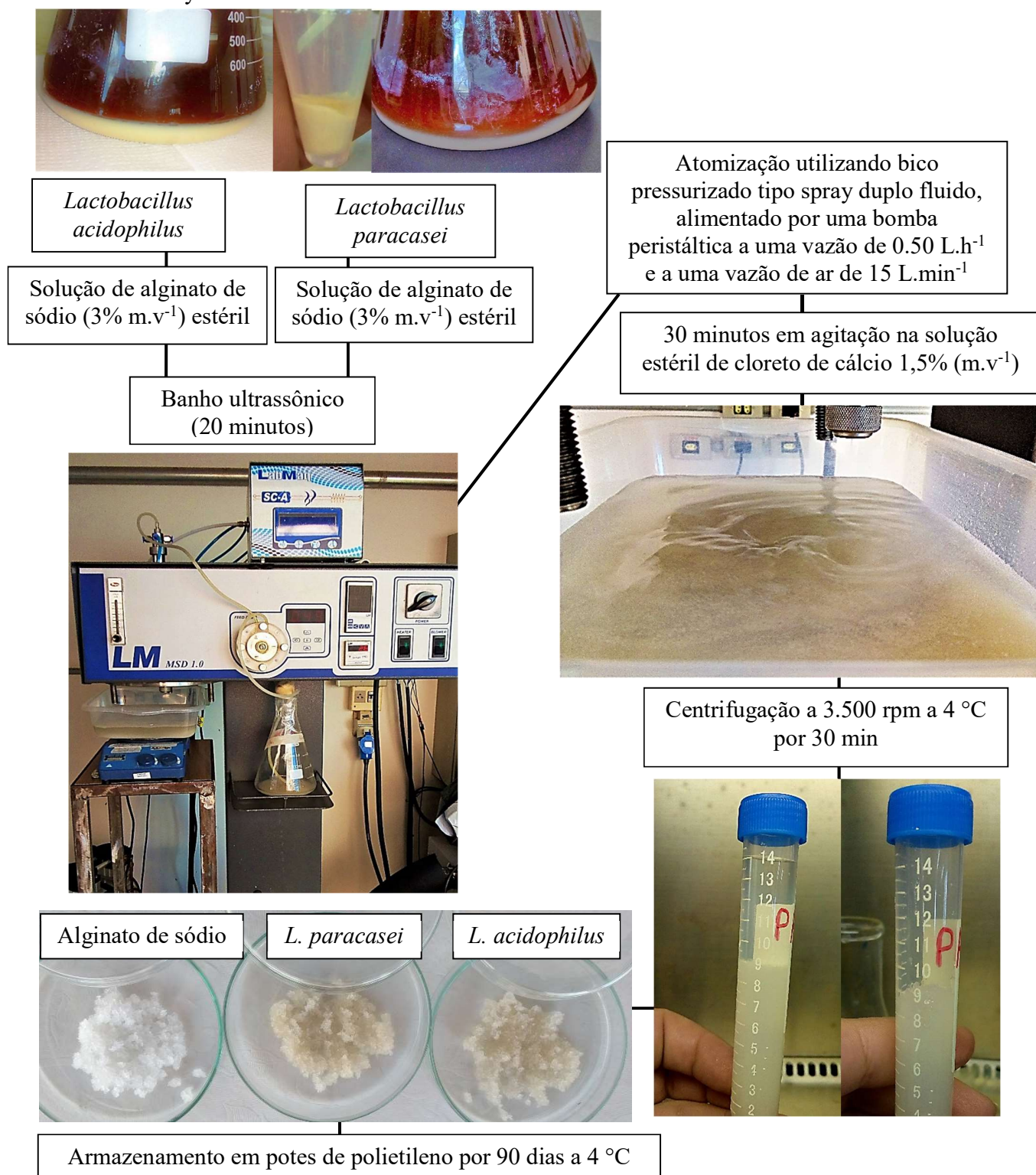
2.2 Produção das microesferas de alginato de cálcio contendo *L.paracasei* e *L. acidophilus*

As microesferas foram produzidas por microencapsulação através da técnica de gelificação iônica externa com atomização por ar pressurizado utilizando o bico pressurizado tipo *spray* duplo fluido do equipamento Spray Dryer, de acordo com a metodologia sugerida por Teixeira (2021) com adaptações (FIGURA 1). Os sedimentos celulares de *L. paracasei* e *L. acidophilus* obtidos no item anterior foram homogeneizados separadamente em solução de alginato de sódio a 3% (p.v⁻¹) estéril (W201502, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). A contagem total de bactérias viáveis na solução de alginato de sódio foi realizada em triplicata por diluições decimais em série e plaqueamento em ágar MRS em placas de Petri. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas com subsequente enumeração dos microrganismos viáveis. A solução do material de parede (alginato de sódio) juntamente com as células de *L. paracasei* e *L. acidophilus* foram submetidas ao banho ultrassônico (Solid Steel, modelo SSBu 3,8 L, São Paulo, Brasil) durante 20 minutos para a retirada de ar ocluso. Após, as soluções foram atomizadas utilizando o bico pressurizado tipo *spray* duplo fluido do equipamento Spray Dryer (Labmaq do Brasil, modelo LM MSD 1.0, Rio Preto, Brasil) alimentado por uma bomba peristáltica a uma vazão de 0,50 L.h⁻¹ (8,33 mL.min⁻¹) e a uma vazão de ar de 15 L.min⁻¹, determinados por pré-testes.

A atomização foi realizada a uma distância de 5 centímetros e as gotas formadas entraram imediatamente em contato com a solução estéril do agente reticulador (cloreto de cálcio 1,5% p.v⁻¹), onde permaneceram sob agitação mecânica constante por 30 minutos. As microesferas foram lavadas com água peptona 0,1 % (p.v⁻¹) em peneiras de aço inoxidável estéreis, filtradas à vácuo e centrifugadas (3.500 rpm/20 min) a 4 °C. O excesso de água foi totalmente removido. Após, foram transferidas para embalagens de polietileno estéreis para armazenamento a temperatura de 4 °C por 90 dias. Microesferas sem bactérias também foram preparadas simultaneamente. Não foram

aplicadas técnicas de secagem nas microesferas, pois o objetivo foi obter microesferas probióticas gelatinosas com altas contagens de bactérias, isentas de danos causados por altas ou baixas temperaturas e com características apropriadas para a aplicação em matrizes alimentares pastosas.

Figura 1 - Fluxograma das etapas de produção das microesferas por gelificação iônica externa com atomização utilizando bico pressurizado tipo *spray* duplo fluido do equipamento Spray Dryer.



Fonte: Da autora (2021).

2.3 Eficiência de encapsulação de *L. paracasei* e *L. acidophilus*

Para verificar a eficiência da microencapsulação, ou seja, comprovar que o microrganismo probiótico foi revestido pelo material de parede, foi realizada em triplicata a contagem de bactérias viáveis nas microesferas e nas soluções de alginato de sódio utilizadas no processo (após a adição das células).

A contagem total de bactérias viáveis na solução de alginato de sódio foi realizada em triplicata por diluições decimais em série e plaqueamento em ágar MRS. Para a realização da contagem de bactérias viáveis nas microesferas de alginato, as células aprisionadas foram liberadas adicionando-se separadamente 1 grama de microesferas de cada probiótico em 9 mL de citrato de sódio 2% (pH 7,0) estéril em triplicata (GROSSO; FÁVARO-TRINDADE, 2004; KAILASAPATHY, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2014). Após 5 minutos de agitação vigorosa em agitador de tubos, as microesferas romperam-se devido a solubilização do hidrogel. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em água peptonada a 0,1% (p.v⁻¹) e plaqueamento em ágar MRS em placas de Petri. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas com subsequente enumeração dos microrganismos viáveis. As contagens totais foram expressas como o logaritmo das unidades formadoras de colônias por mililitro (solução de alginato de sódio) ou gramas (massa de microesferas de alginato de cálcio) (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960).

A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada pela Equação 1 (FARIAS *et al.*, 2019):

$$EE = \frac{N}{N_0} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde N é o número de células aprisionadas viáveis liberadas das microesferas e N₀ é o número de células livres presentes na solução de alginato de sódio antes da gelificação iônica.

2.4 Morfologia e distribuição de tamanho das microesferas

As características microestruturais das microesferas desidratadas contendo *L. paracasei* e *L. acidophilus* foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V) com aumentos de 700 e 1200 vezes com Aceleração de Voltagem Variável de 20 kV e distância de trabalho de 9,0 e 9,5 mm utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura (Carl Zeiss Microscopy GmbH, modelo LEO EVO 40 XVP, Cambridge, Reino Unido) no Laboratório de Microscopia Eletrônica

e Análise Ultraestrutural anexo ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

A análise das microesferas úmidas foi realizada no Laboratório de Enzimas Microbianas do Departamento de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras através de observação em microscópio óptico (Nikon do Brasil Ltda, modelo Eclipse E200 LED Trinocular com câmera digital acoplada, São Paulo, Brasil).

O diâmetro e a distribuição de tamanho das microesferas úmidas foram determinados utilizando o *software* Zeiss Axion Vision® após a avaliação de microesferas previamente coradas com violeta de metila e distribuídas em lamínulas de vidro observadas sob o microscópio em pelo menos dez imagens obtidas de cada tratamento. O diâmetro médio das microesferas foi expresso segundo o diâmetro médio de Sauter ($D_{(32)}$), calculado pela Equação 2.

$$D_{(32)} = \frac{\sum nidi^3}{\sum nidi^2} \quad (2)$$

Onde d_i é o diâmetro das microesferas (μm) e n_i é número de microesferas de diâmetro d_i .

2.5 Resistência térmica dos probióticos livres e microencapsulados

A viabilidade ao estresse térmico das microesferas de *L. paracasei* e *L. acidophilus* e das células livres foi avaliada conforme proposto por Bosnea, Moschakis e Biliaderis (2014) e De Matos-Júnior *et al.* (2019), com adaptações. Foram adicionados 2 gramas das microesferas e 2 mL da suspensão contendo as células livres separadamente em tubos de ensaio contendo 5 mL de água peptonada 0,1%. Três tubos de ensaio foram preparados para cada tempo e temperatura e os conteúdos foram submetidos às temperaturas de 50, 55, 60, 65 e 70 °C em banho-maria digital (Tecnal, modelo TE-054-MAG, Piracicaba, Brasil) por 0, 10, 20 e 30 minutos. Após o término de cada tratamento térmico, as microesferas foram solubilizadas com solução de citrato de sódio a 2% (p.v⁻¹) estéril pH 7,0 sob agitação vigorosa para liberar os microrganismos (RIBEIRO *et al.*, 2014). A contagem de bactérias viáveis foi realizada através de diluições decimais seriadas em água peptonada a 0,1% (p.v⁻¹) seguida de plaqueamento em ágar MRS. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 48 horas (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960).

2.6 Viabilidade de *L. paracasei* e *L. acidophilus* livres e microencapsulados em condições gastrointestinais simuladas

A avaliação da sobrevivência das células livres e microencapsuladas em condições gástricas e entéricas foram realizadas por simulação *in vitro* em triplicata de acordo com o método descrito por Gbassi *et al.* (2009) e De Matos-Júnior *et al.* (2019), com adaptações.

Na primeira etapa, o fluido gástrico simulado foi preparado com 3 g.L⁻¹ de pepsina e 9 g.L⁻¹ de NaCl em água destilada estéril e o pH da solução foi ajustado para 1.8 com HCl 1M. As células livres (1 mL) e microencapsuladas (1 g) de *L. paracasei* e *L. acidophilus* foram adicionadas separadamente ao suco gástrico (9 mL) e incubadas a 37 °C a 100 rpm. A contagem de bactérias viáveis foi realizada após 0, 60 e 120 minutos por diluição seriada e plaqueamento em ágar MRS, após a solubilização do hidrogel com citrato de sódio 2% (p.v⁻¹) (RIBEIRO *et al.*, 2014). Na segunda etapa, o material resultante da digestão ácida foi recuperado por centrifugação e inoculado no fluido intestinal simulado preparado com 9 g.L⁻¹ de NaCl, 10 g.L⁻¹ de pancreatina, 9 g.L⁻¹ de tripsina e 3 g.L⁻¹ de sais biliares Oxgall (Himedia, Mumbai, Índia) em água destilada estéril com pH ajustado para 6.5 com NaOH 1M. Após 120 e 180 minutos de incubação no fluido intestinal a 37 °C sob agitação, as células viáveis foram enumeradas em ágar MRS.

2.7 Viabilidade de *L. paracasei* e *L. acidophilus* microencapsulados durante o armazenamento

A avaliação da viabilidade de *L. paracasei* e *L. acidophilus* livres e microencapsulados durante o armazenamento em temperatura de refrigeração (4 °C) foi realizada quinzenalmente por um período de 90 dias, utilizando a metodologia proposta por De Matos-Júnior *et al.* (2019), com adaptações. Em 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias, as microesferas armazenadas em potes plásticos estéreis foram solubilizadas com citrato de sódio 2% (p.v⁻¹) (pH 7,0) estéril e a contagem total de bactérias viáveis foi realizada através de diluições decimais seriadas em água peptona a 0,1% (p.v⁻¹) seguida de plaqueamento em ágar MRS, em triplicata.

2.8 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos em média de três repetições. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e diferenças significativas entre os valores das médias foram determinados pelo teste de Scott-Knott com nível de significância de 5%. As análises foram realizadas no *software* Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Eficiência de Encapsulação

As soluções de alginato de sódio adicionadas das células livres de *L. paracasei* e de *L. acidophilus* utilizadas na gelificação iônica apresentaram contagens médias totais diferentes (TABELA 1) de $10,39 \pm 0,02$ e de $10,86 \pm 0,06$ log UFC/mL, respectivamente. As microesferas apresentaram contagens médias totais ($p < 0,05$) de *L. paracasei* de $9,97 \pm 0,05$ log UFC/g e as contendo *L. acidophilus* de $10,11 \pm 0,08$ log UFC/g. Do ponto de vista tecnológico, maiores concentrações de bactérias nas microesferas probióticas são desejáveis, pois permitem a aplicação em menores quantidades em formulações funcionais, sem alterar a textura do produto.

Tabela 1 - Eficiência de microencapsulação (%), contagens antes e após a microencapsulação (log UFC/g).

Tratamentos	Contagem antes da microencapsulação (log UFC/g)	Contagem nas microesferas (log UFC/g)	Eficiência da microencapsulação (%)
<i>L. paracasei</i>	$10,39 \pm 0,02b$	$9,97 \pm 0,05b$	$95,95 \pm 0,68a$
<i>L. acidophilus</i>	$10,86 \pm 0,06a$	$10,11 \pm 0,08a$	$93,15 \pm 0,26b$

Fonte: Da autora (2021).

Porém, para que esses benefícios sejam obtidos, é importante que os microrganismos cheguem viáveis ao intestino e sejam consumidos em uma concentração mínima de $10^8 - 10^9$ UFC/recomendação diária do produto ou $10^6 - 10^7$ UFC/mL ou g do alimento. O consumo dos probióticos deve ser seguro para o consumidor (ANVISA, 2018; FAO/WHO, 2002; LUYER *et al.*, 2005).

Esses resultados indicam que técnica de gelificação iônica externa, sem o emprego de técnicas adicionais para a secagem, foi eficaz para a obtenção de microesferas probióticas com concentrações de bactérias satisfatórias e eficiência de encapsulação ($p < 0,05$) de $95,95 \pm 0,68\%$ para *L. paracasei* e de $93,15 \pm 0,26\%$ para *L. acidophilus*. O rendimento ou eficiência da encapsulação é influenciado pela técnica utilizada, agente encapsulante, tipo de bactéria (PICOT; LACROIX, 2004) e condições de encapsulação como a temperatura e o uso de solventes (POLETTO *et al.*, 2019). As altas eficiências de encapsulação obtidas neste trabalho podem ser explicadas pela composição química do hidrogel de alginato utilizado como material de parede, que permite interações com materiais polares e menos polares simultaneamente. Dessa forma, a hidrofobicidade e hidrofiliabilidade da superfície celular das cepas microencapsuladas não prejudicaram a retenção das bactérias no hidrogel e durante a formação das microesferas não houve grande passagem de bactérias para o meio aquoso. Para conseguir aderir à mucosa intestinal e colonizar as células, as cepas probióticas devem apresentar uma superfície hidrofóbica (DEL RE *et al.*, 2008).

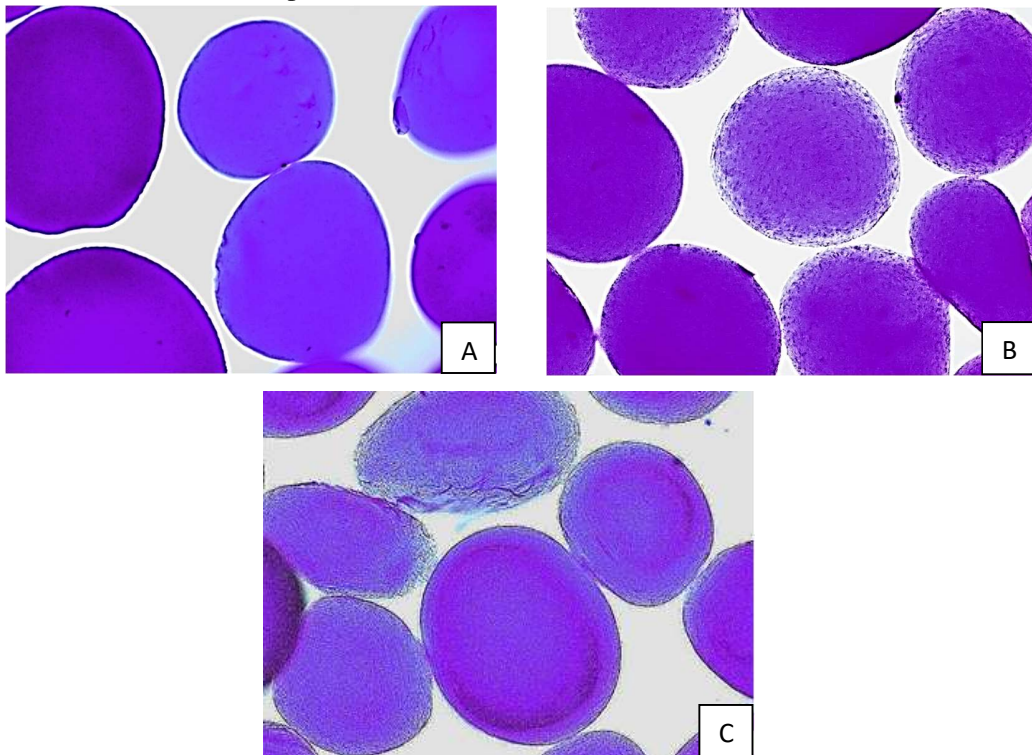
Reis *et al.* (2006) indicaram que efeitos de cisalhamento causados pelas técnicas de atomização poderiam prejudicar a viabilidade de cepas encapsuladas, o que não corrobora com os resultados obtidos neste trabalho e os apresentados por Ribeiro *et al.* (2014), que observaram redução do número de células viáveis de *L. acidophilus* apenas devido ao fator de diluição e por Poletto *et al.* (2019) que obtiveram 94,04% de rendimento na encapsulação de *L. acidophilus* em alginato, inferindo que os componentes do material de parede podem prevenir danos durante a pulverização e absorver a tensão de cisalhamento.

3.2 Morfologia e distribuição de tamanho das microesferas

A análise visual das fotografias das microesferas sem bactérias e com *L. paracasei* e *L. acidophilus* obtidas por microscopia ótica permite inferir que as microesferas úmidas não apresentaram diferenças estruturais em relação ao conteúdo. As microesferas apresentaram formato esférico, corroborando com Chun, Kim e Cho (2014), Aguilar *et al.* (2015) e Sousa *et al.* (2015), superfície lisa e boa distribuição das bactérias no núcleo das microesferas.

A coloração azul violeta adquirida pelas microesferas (FIGURA 2) facilitou a visualização da superfície que se revelou totalmente preservada, com ausência de rachaduras e zonas ocas em todos os tratamentos.

Figura 2 - Microscopia óptica das microesferas produzidas em aumento de 400x: (A) Microesferas sem fase interna ou núcleo; (B) Microesferas contendo *L. paracasei*; (C) Microesferas contendo *L. acidophilus*.

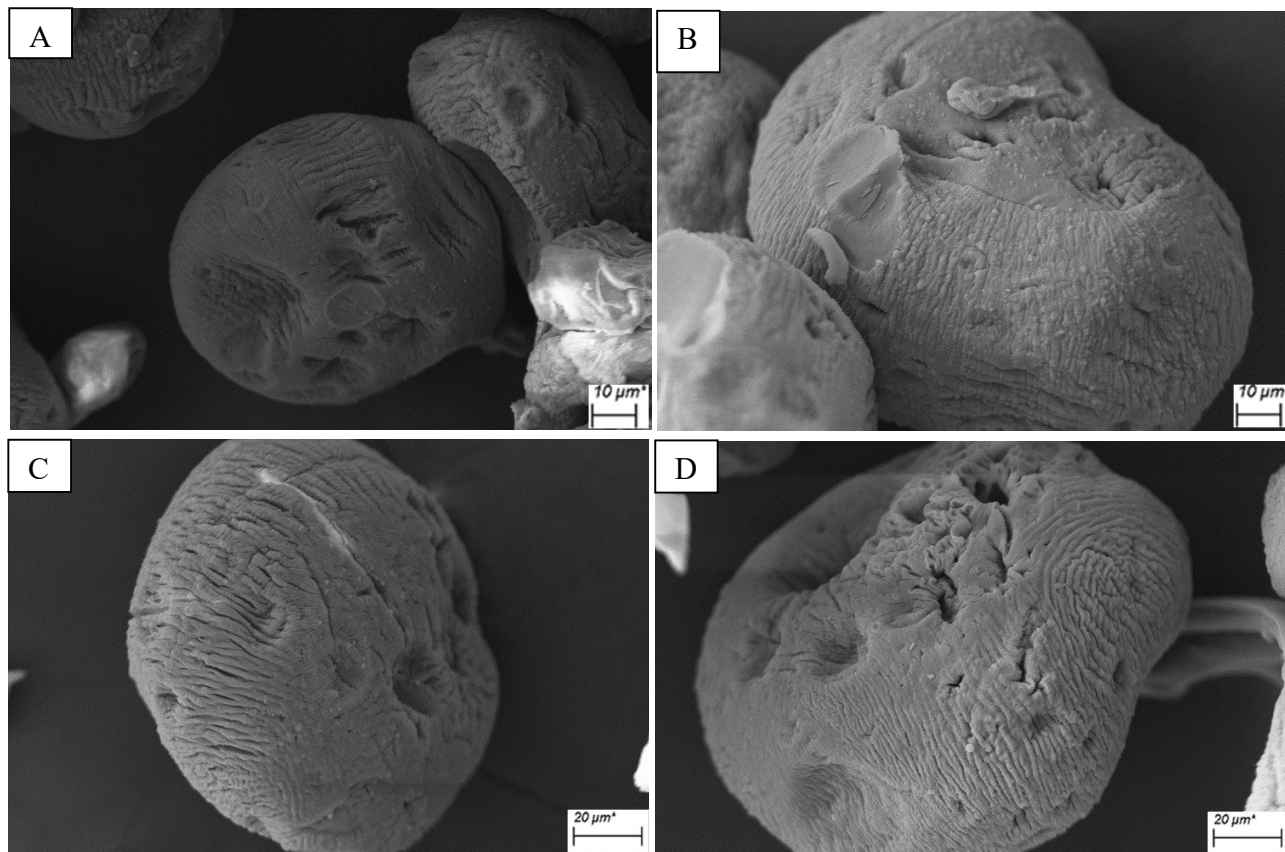


Fonte: Da autora (2021).

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada com o objetivo de comparar e analisar com detalhes as superfícies, as características estruturais e a porosidade das microesferas produzidas (FIGURA 3). O tipo de cepa encapsulada não alterou os formatos das microesferas que foram semelhantes entre os tratamentos, esféricos e achatados. As microesferas após a liofilização apresentam endurecimento do gel de alginato e a superfície apresentou rugas e aparência áspera.

Foi possível observar nas superfícies de todas as microesferas algumas concavidades, alguns poros possivelmente causados pelo processo de liofilização (necessário para realizar a MEV) e ausência de rachaduras e células na superfície.

Figura 3 - Eletromicrografias obtidas em aumentos de 700X (A) e de 1200X (B, C e D) das microesferas contendo *L. acidophilus* (A e B) e *L. paracasei* (C e D).



Fonte: Da autora (2021).

Na Tabela 2 estão representados os diâmetros médios de Sauter (D_{32}) das microesferas. O diâmetro das microesferas variou de $100,36 \pm 0,61$ a $101,12 \pm 0,62$ μm e foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as microesferas produzidas, indicando que o tipo de probiótico microencapsulado influenciou no tamanho das microesferas. Observa-se que as microesferas vazias, sem o probiótico, apresentaram o menor diâmetro e as carregadas com *L. paracasei* o maior.

O tamanho das microesferas irá depender das características do material de parede, do polímero, da técnica de gotejamento, vazão e pressão de ar utilizados no processo, distância entre o bico e a solução gelificante e outros (YANG *et al.*, 2015). O processo de gelificação iônica externa com auxílio do bico pressurizado duplo fluido do equipamento Spray Dryer, utilizado os parâmetros: vazão de ar ($15 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$), pressão de ar ($0,50 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$), concentração de alginato 3% (m.v

¹⁾ e distância entre o bico duplo fluido e a solução (5 cm), produziu microesferas probióticas de tamanhos médios de 100,94 μm .

Tabela 2 – Valores dos diâmetros médios de Sauter (D_{32}) das microesferas de alginato.

Tratamentos	$D_{(32)}$ (μm)
Microesferas não carregadas	100,36 \pm 0,61c
Microesferas contendo <i>L. paracasei</i>	101,12 \pm 0,62a
Microesferas contendo <i>L. acidophilus</i>	100,74 \pm 0,63b

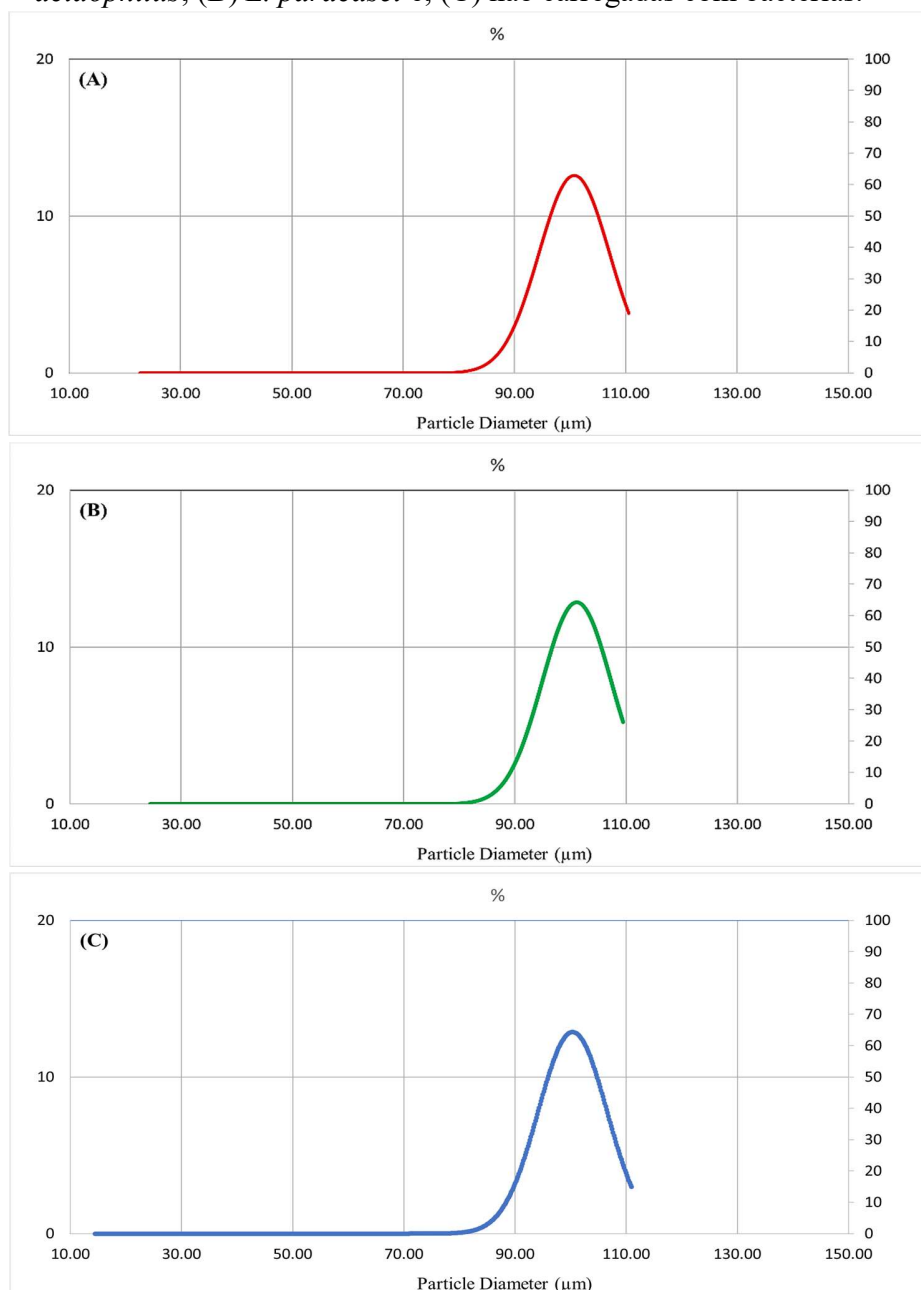
Médias seguidas de mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

Fonte: Da autora (2021).

Hansen *et al.* (2002), Chandramouli *et al.* (2004) e Cook *et al.* (2012) observaram que a proteção das bactérias encapsuladas sob condições gástricas simuladas aumentaram com o tamanho das microesferas, e que diâmetros menores que 100 μm , são menos eficientes para proteger as bactérias no suco gástrico (pH 2-3).

Ribeiro *et al.* (2014) relataram menor aceitação do iogurte contendo *L. acidophilus* LA-5 encapsulado (tamanho médio da microesfera 253,3 \pm 23,8 μm), em relação ao atributo textura, maior proteção das bactérias durante 35 dias de armazenamento refrigerado e às condições gastrointestinais. Homayouni *et al.* (2008) adicionaram microesferas probióticas de diâmetro médio de 17,80 \pm 3,55 μm no sorvete e não observaram alterações nas propriedades sensoriais. Seyedain-Ardabili, Sharifan e Tarzi, (2016) adicionaram microesferas de *L. acidophilus* com diâmetro médio de 216,6 μm e de *L. casei* de 352,8 μm em pães e também não observaram efeitos significativos na textura. Dessa forma, para a elaboração de produtos funcionais estáveis, com boa aceitação sensorial, contendo bactérias protegidas ao longo do trato gastrointestinal, é necessário avaliar a compatibilidade das características físicas da matriz alimentar e das microesferas probióticas, que podem apresentar-se úmidas, secas e de tamanhos variados. As curvas de distribuição de tamanho mostram a homogeneidade do método de gelificação iônica externa em produzir microesferas de tamanhos iguais.

Figura 4 – Curvas de distribuição de tamanho das microesferas de alginato contendo: (A) *L. acidophilus*; (B) *L. paracasei* e; (C) não carregadas com bactérias.



Fonte: Da autora (2021).

As curvas de distribuição de tamanho das microesferas produzidas mostram a homogeneidade no tamanho das microesferas produzidas. Os resultados obtidos foram semelhantes aos relatados por Yeung *et al.* (2016) que observaram homogeneidade na distribuição nos

diâmetros médios de $161 \pm 107 \mu\text{m}$ e de $130 \pm 94 \mu\text{m}$ dos grânulos de alginato com *L. lactis* e sem probióticos, respectivamente.

3.3 Resistência térmica dos probióticos livres e microencapsulados

A microencapsulação utilizando a técnica de gelificação iônica foi eficaz na proteção de *L. paracasei* e de *L. acidophilus* contra a ação do calor. Na comparação das viabilidades de *L. paracasei* livre com *L. paracasei* microencapsulado, e de *L. acidophilus* livre com *L. acidophilus* microencapsulado, é possível observar que em todos os tratamentos térmicos (tempo x temperatura), as contagens médias totais das células microencapsuladas foram maiores ($p < 0,05$) quando comparadas às contagens das células livres após exposição ao calor.

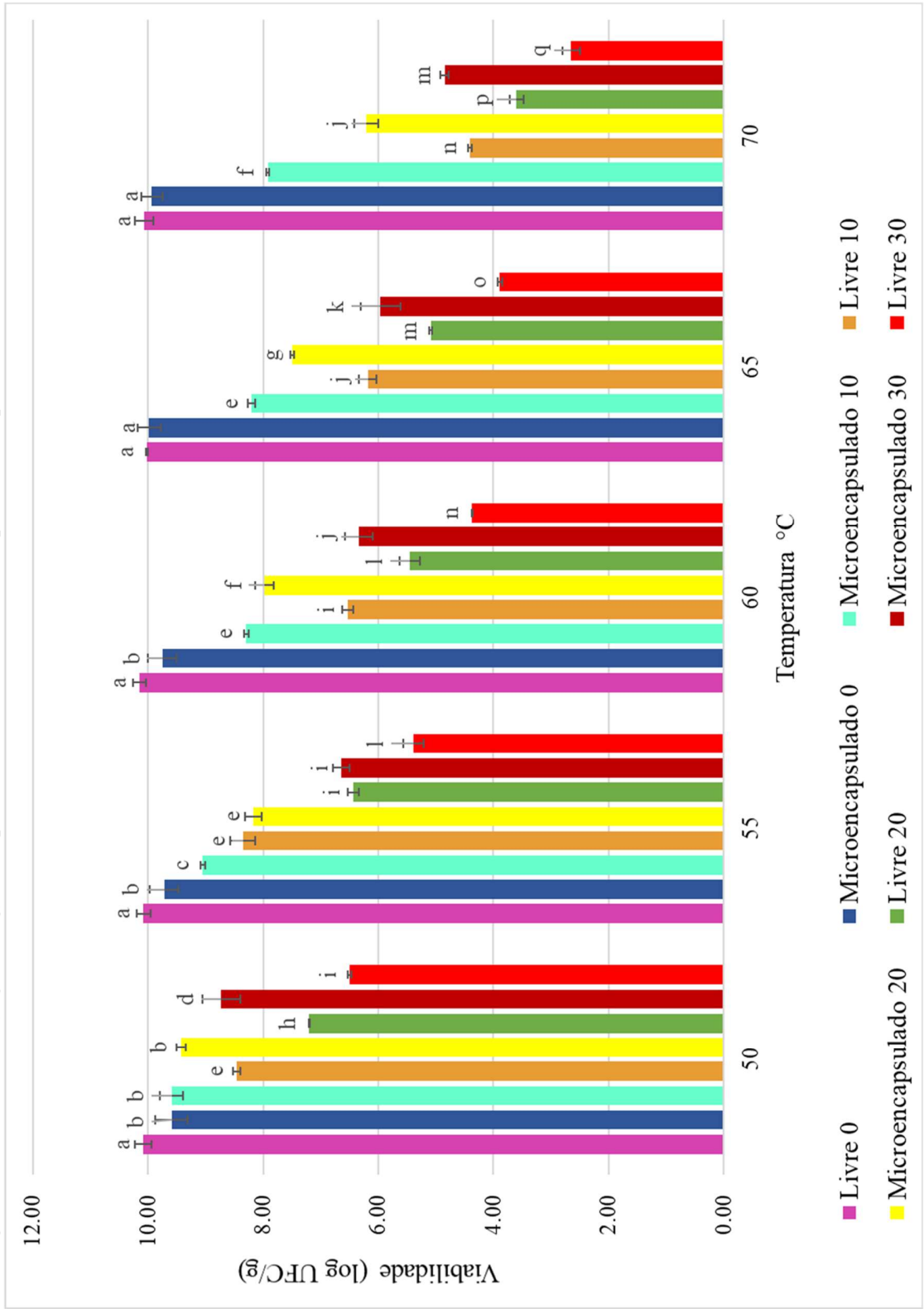
Observa-se na Figura 5 que as microesferas de *L. paracasei* apresentaram viabilidade necessária para alegação de alimento funcional preservadas após 20 minutos de exposição a temperatura de $70 \text{ }^\circ\text{C}$ ($6,21 \pm 0,21 \text{ log UFC/g}$), enquanto as células livres reduziram mais rapidamente e apresentaram contagens de $6,18 \pm 0,15 \text{ log UFC/g}$ em apenas 10 minutos de exposição a $65 \text{ }^\circ\text{C}$.

Após 30 minutos de exposição a $70 \text{ }^\circ\text{C}$, as células livres e microencapsuladas de *L. paracasei* reduziram em média 73,65 e 51,15% (escala logarítmica) ou perderam a viabilidade em 7,41 e 5,08 log UFC/g e permaneceram com viabilidade de 2,65 e 4,85 log UFC/g, respectivamente.

Em 30 minutos de exposição ao calor, a microencapsulação evitou reduções na viabilidade de *L. paracasei* de 2,77 log UFC/g a $50 \text{ }^\circ\text{C}$; 1,61 log UFC/g a $55 \text{ }^\circ\text{C}$; 2,37 log UFC/g a $60 \text{ }^\circ\text{C}$; 2,11 log UFC/g a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ e; 2,33 log UFC/g a $70 \text{ }^\circ\text{C}$.

Poucos estudos avaliaram a proteção por microencapsulação de cepas probióticas ao estresse térmico em diferentes temperaturas e em pequenos intervalos de tempo. No entanto, Bosnea, Moschakis e Biliaderis (2014) encontraram viabilidades semelhantes de *L. paracasei* microencapsulados por coacervação complexa (acima de 50%), após 30 minutos de tratamento térmico a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ e Ding e Shah (2007) também observaram perdas médias de 4,17 log UFC/mL, analisando diversas cepas probióticas microencapsuladas em matriz de alginato.

Figura 5 - Viabilidade (log UFC/g) de *L. paracasei* livres e microencapsulados expostos a diferentes tratamentos térmicos.



Fonte: Da autora (2021).

Os resultados apresentados corroboram com Xiao *et al.* (2020), que observaram taxas de sobrevivência mais elevadas de *L. paracasei* microencapsulados (diminuição de 9,66 log UFC/g para 9,05, 8,65 e 5,87 log UFC/g a 55, 65 e 75 °C, respectivamente, após 10 minutos) em comparação às células livres, que apresentaram diminuição total de 6 ciclos logarítmicos, nos mesmos tratamentos térmicos.

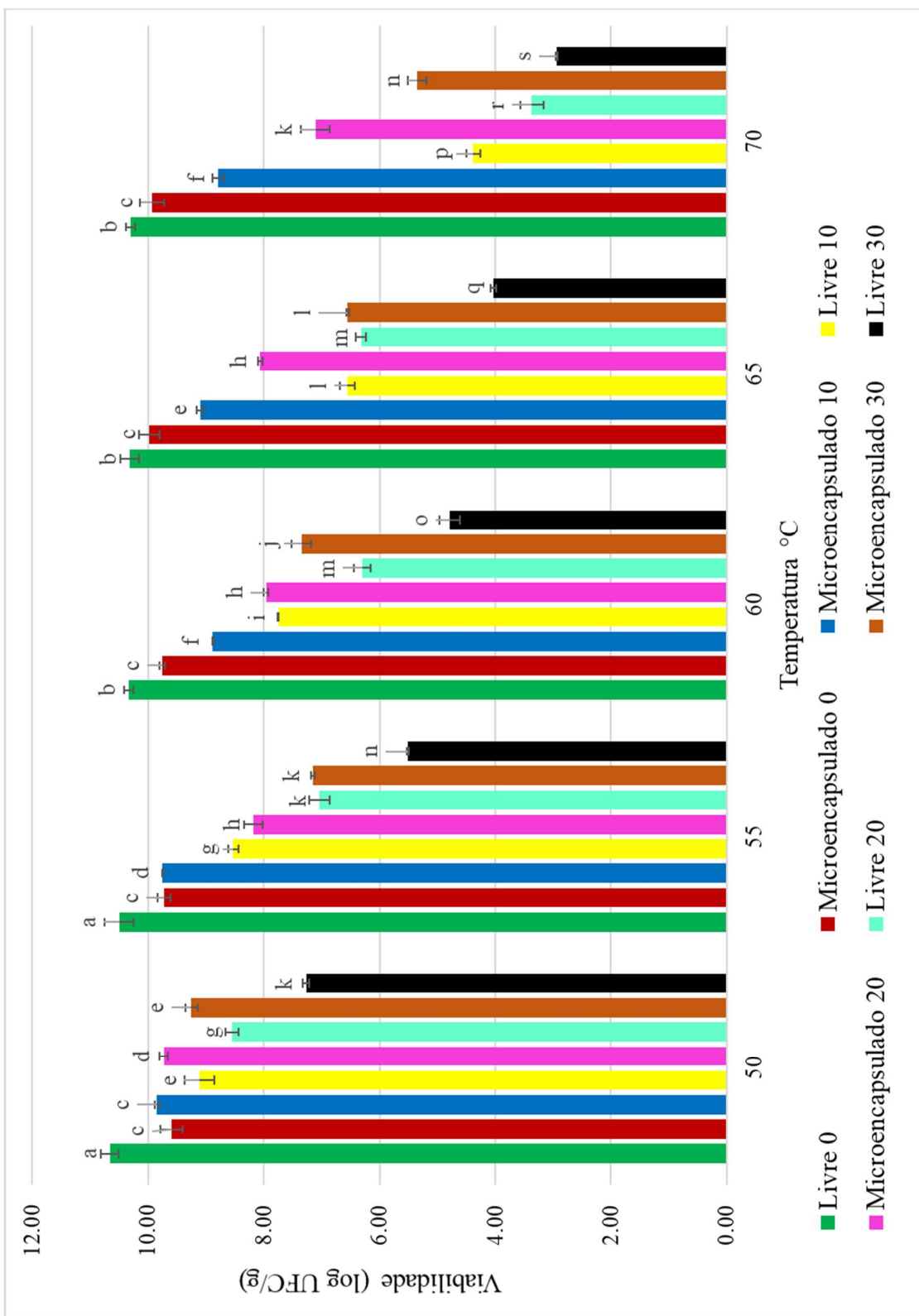
Para *L. acidophilus*, após 30 minutos de exposição ao calor, a microencapsulação evitou reduções na viabilidade de 2,75 log UFC/g a 50 °C; 2,22 log UFC/g a 55 °C; 2,93 log UFC/g a 60 °C; 2,77 log UFC/g a 65 °C e; 2,8 log UFC/g a 70 °C. As viabilidades de *L. acidophilus* livre e microencapsulado (FIGURA 6) permaneceram em $6,32 \pm 0,09$ e $7,11 \pm 0,25$ log UFC/g nas temperaturas de 65 °C e 70 °C, após 20 minutos, respectivamente. Na maior temperatura (70 °C), após 30 minutos de exposição, as viabilidades das células livres e microencapsuladas de *L. acidophilus* reduziram em média 71,45 e 46,01% (escala logarítmica) ou perderam a viabilidade em 7,36 e 4,56 log UFC/g e permaneceram com viabilidade de 2,94 e 5,35 log UFC/g, respectivamente.

O uso do alginato na concentração de 3% na microencapsulação impediu o rompimento das microesferas durante o aquecimento e promoveu maior proteção às células probióticas. De acordo com Cavalheiro *et al.* (2019), Ding e Shan (2007), Mandal, Puniya e Singh (2006), Shaharuddin e Muhamad (2015), maiores concentrações de alginato de sódio impedem a difusão rápida de água na matriz durante o aquecimento, o que reduz a taxa de permeabilidade e, conseqüentemente, a transferência de calor para as células aprisionadas.

De acordo com Christiansen *et al.* (2006), a resistência ao calor de *Lactobacillus* depende da variação genética entre espécies e cepas, proteção cruzada contra diferentes estresses ambientais e resposta adaptativa (PERIAGO; ABEE; WOUTERS, 2002). É afetada também pelo estado fisiológico das células e fatores ambientais, tais como pH, atividade de água, concentrações de sais e conservantes (CROW *et al.*, 2002).

No estudo da resistência térmica, os probióticos livres perderam a viabilidade ($>10^6$ - 10^7 UFC/g) após 30 minutos a 55 °C. *L. paracasei* microencapsulados perderam a viabilidade após 30 minutos a 65 °C e a maior resistência térmica foi observada para *L. acidophilus* microencapsulados que perderam a viabilidade somente após 30 minutos a 70 °C.

Figura 6 - Viabilidade (log UFC/g) de *L. acidophilus* livres e microencapsulados expostos a diferentes tratamentos térmicos.



Fonte: Da autora (2021).

3.4 Viabilidade de *L. paracasei* e *L. acidophilus* livres e microencapsulados em fluido gástrico e intestinal simulados

A tecnologia de microencapsulação tem sido muito utilizada para conferir proteção aos probióticos, demonstrando resultados satisfatórios (DE ANDRADE *et al.*, 2019; DE MATOS-JÚNIOR *et al.*, 2019; XIAO *et al.*, 2020).

Diminuições significativas ($p < 0,05$) na viabilidade de *L. paracasei* foram observadas na primeira hora de incubação em fluido gástrico (FIGURA 7). Durante o tempo total de incubação dos probióticos em condições gástricas simuladas (120 minutos) a viabilidade de *L. paracasei* livres e microencapsulados diminuíram 2,58 e 1,32 ciclos logarítmicos, respectivamente. Nessa etapa, a microencapsulação evitou reduções médias de 1,26 log UFC/g de *L. paracasei*.

Durante o período de exposição ao fluido gástrico, também foram observadas diminuições significativas ($p < 0,05$) na viabilidade de *L. acidophilus* livre e microencapsulado (FIGURA 8), de 2,62 e 1,44 ciclos logarítmicos, respectivamente.

L. paracasei e *L. acidophilus* foram mais resistentes às condições intestinais (240 - 300 minutos) em comparação às condições gástricas (0 - 120 minutos), corroborando com De Matos-Júnior *et al.* (2019), que observaram menores efeitos dos fluidos intestinais em *L. paracasei* BGP1 e *L. rhamnosus* 64 microencapsulados.

Na avaliação geral da viabilidade de células microencapsuladas às condições gastrointestinais (0 a 300 minutos) a microencapsulação evitou reduções médias de 2,18 e 2,68 log UFC/g de *L. paracasei* e *L. acidophilus*, respectivamente.

As perdas acumuladas nas viabilidades de *L. paracasei* livres e microencapsulados (FIGURA 7) foram de 4,26 e 2,08 log UFC/g e de *L. acidophilus* livres e microencapsulados (FIGURA 8) foram de 5,0 e 2,32 log UFC/g, respectivamente.

Figura 7 – Viabilidade (log UFC/g) de *L. paracasei* livres e microencapsulados em condições gastrointestinais simuladas. As contagens em 0, 60, 120, 240 e 300 minutos foram comparadas para cada cepa. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, são significativamente diferentes pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

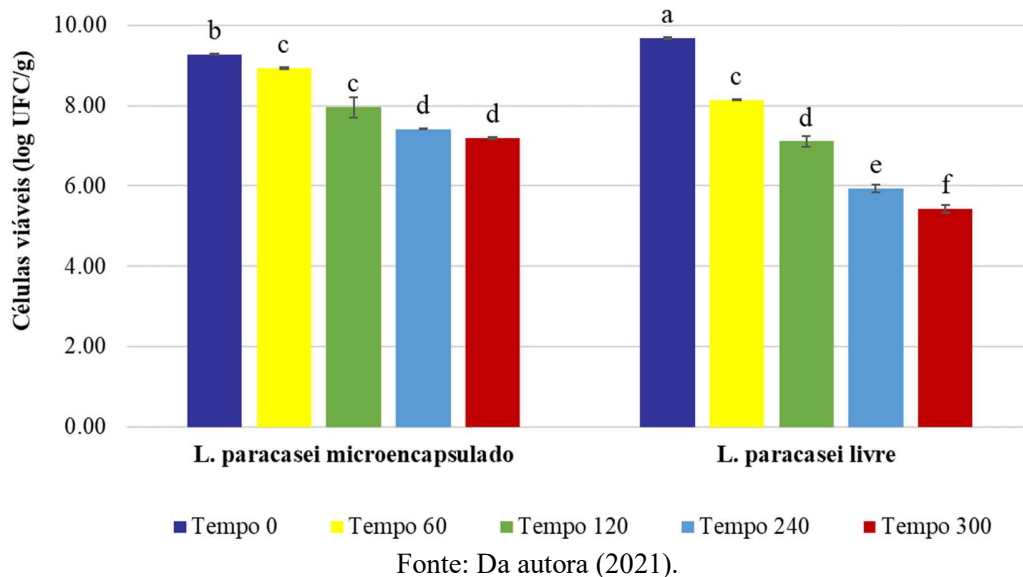
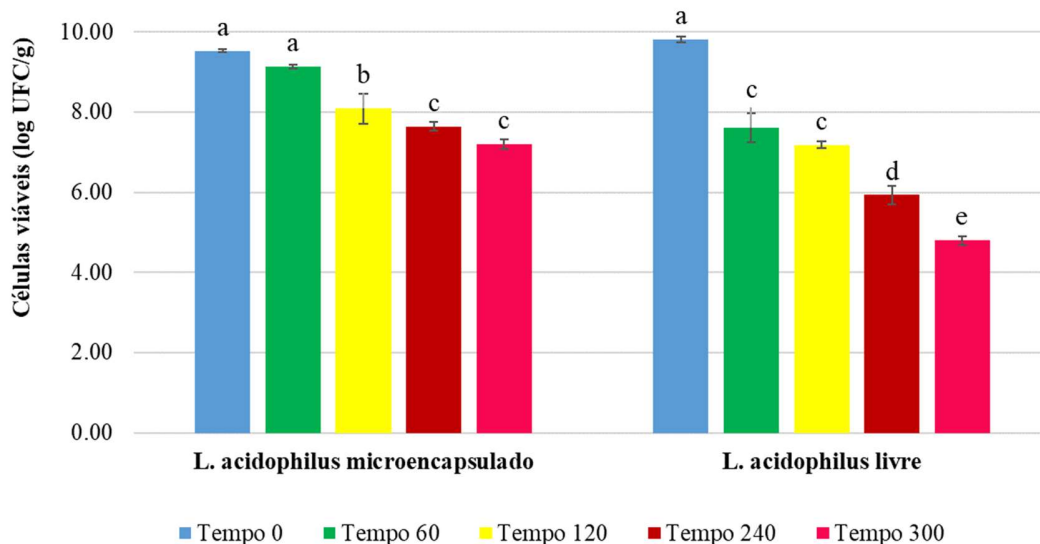


Figura 8 – Viabilidade (log UFC/g) de *L. acidophilus* livres e microencapsulados em condições gastrointestinais simuladas. As contagens em 0, 60, 120, 240 e 300 minutos foram comparadas para cada cepa. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes são significativamente diferentes pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).



Estudos demonstram que a resistência das bactérias probióticas às condições de baixo pH e aos sais biliares, são específicos para cada cepa (BOSNEA; MOSCHAKIS; BILIADERIS, 2014; CHÁVARRI *et al.*, 2010; DE ANDRADE *et al.*, 2019). No entanto, Sousa *et al.* (2015) mostraram que as cepas de *L. acidophilus* foram mais resistentes em condições simuladas do duodeno quando comparadas a *L. paracasei*, comportamento contrário ao relatado por esse estudo.

A microencapsulação apresentou resultados satisfatórios na proteção das cepas em condições gastrointestinais simuladas, preservando as viabilidades das células microencapsuladas de *L. paracasei* e *L. acidophilus* em 77,58 e 75,63% (escala logarítmica). As contagens das células microencapsuladas de *L. paracasei* e de *L. acidophilus* permaneceram acima da dose recomendada para efeitos benéficos à saúde, 7,20 log UFC/g. As células não microencapsuladas permaneceram em 5,43 e 4,80 log UFC/g, respectivamente.

3.5 Viabilidade de *L. paracasei* e *L. acidophilus* microencapsulados durante o armazenamento

Para a aplicação de probióticos em produtos alimentícios, é necessário conhecer as mudanças na população de cepas viáveis durante o armazenamento, e utilizá-las como um dos critérios para a seleção das bactérias. A técnica utilizada de microencapsulação deve garantir a sobrevivência das bactérias durante o processamento e a viabilidade das cepas até o momento do consumo do produto (BOSNEA; MOSCHAKIS; BILIADERIS, 2014).

Na Figura 9 estão representadas as médias das contagens totais de células livres e microencapsuladas, viáveis durante o armazenamento a 4 °C por 90 dias.

As células livres de *L. paracasei* apresentaram diminuições significativas em todos os tempos de armazenamento analisados, apresentando reduções médias de 6,51 log UFC/mL e viabilidade final de 3,27 log UFC/mL. As células microencapsuladas de *L. paracasei* apresentaram diminuições menores de 1,42 log UFC/g e viabilidade final de 7,82 log UFC/g. A microencapsulação protegeu significativamente as cepas e evitou reduções de 5,09 UFC/g de *L. paracasei*.

As células livres de *L. acidophilus* apresentaram diminuições significativas médias de 6,48 log UFC/g e viabilidade final de 2,62 log UFC/mL. As células microencapsuladas de *L. acidophilus*

apresentaram as maiores diminuições em relação às encontradas para *L. paracasei*, de 2,36 log UFC/g e viabilidade final de 6,48 log UFC/mL.

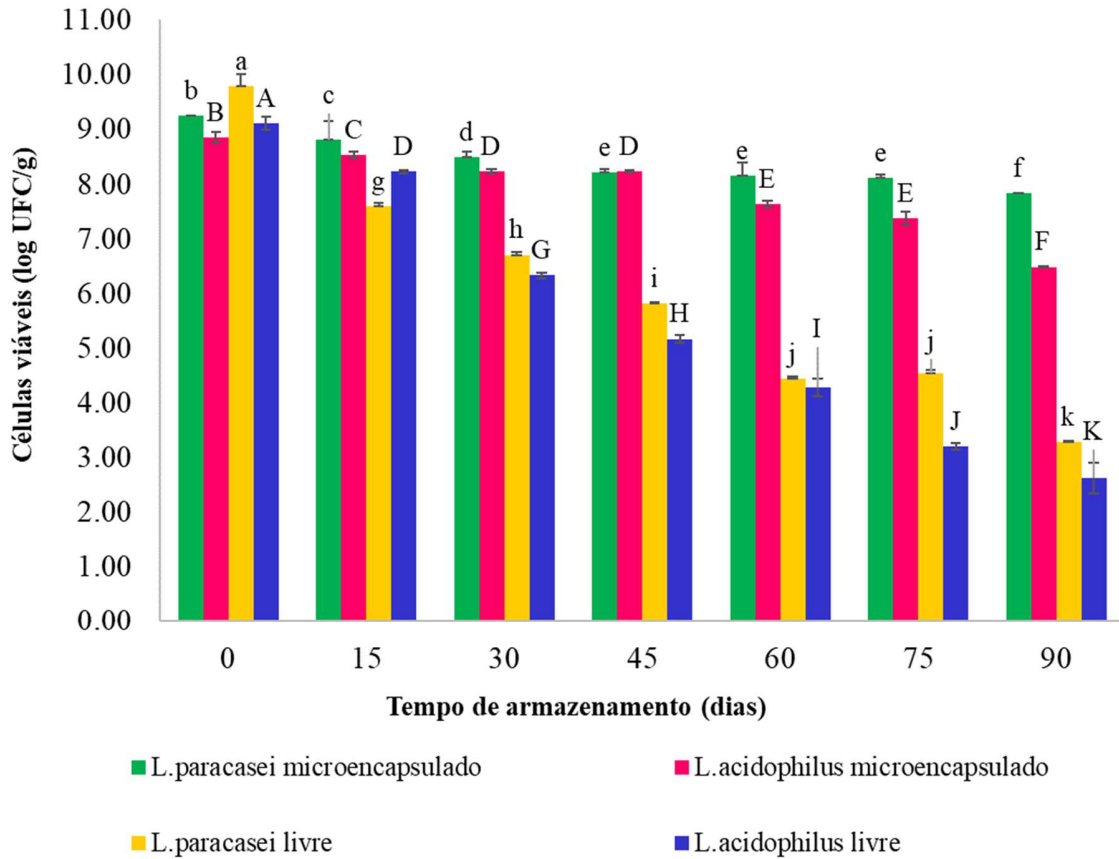
No armazenamento por 90 dias as células microencapsuladas de *L. paracasei* diminuíram cerca de 15,36% enquanto as células microencapsuladas de *L. acidophilus* reduziram 26,69% (escala logarítmica).

Os resultados obtidos são semelhantes aos relatados por Bosnea, Moschakis e Biliaderis (2014), os quais observaram após 60 dias de armazenamento, viabilidades de mais de 86% (escala logarítmica) para *L. paracasei* e *L. paraplantarum*, microencapsulados por coacervação complexa usando isolado de proteína de soro de leite e goma arábica, e viabilidades de cerca de 53-58% (escala logarítmica) para as células livres.

Na preservação das viabilidades de *L. paracasei* e *L. acidophilus* durante o armazenamento, pelo uso da técnica de microencapsulação por gelificação iônica, a microencapsulação evitou diminuições de 5,09 log UFC/g de *L. paracasei* e de 4,12 log de *L. acidophilus*.

L. acidophilus e *L. paracasei* são microrganismos anaeróbicos catalase-negativos. De acordo com Ballus *et al.* (2010), a maioria das bactérias probióticas são suscetíveis ao oxigênio, embora essa tolerância dependa da espécie. Sendo assim, uma possível explicação para a grande redução na viabilidade das células livres observadas durante o armazenamento foi o uso de embalagens plásticas permeáveis ao oxigênio, uma vez que o apropriado seria a utilização de embalagens de vidro que são menos permeáveis. A presença de oxigênio pode resultar no acúmulo de peróxido de hidrogênio, que é facilitado pela ausência da enzima catalase nas bactérias avaliadas, apresentando potencial de reação com outros compostos e de produção de substâncias inibidoras (BALLUS *et al.*, 2010). A microencapsulação constituiu uma barreira de proteção aos microrganismos que ficaram menos suscetíveis à toxicidade do oxigênio, no armazenamento por 90 dias a 4 °C.

Figura 9 – Viabilidade de *L. acidophilus* e *L. paracasei* livres e microencapsulados armazenados a temperatura de 4 °C durante 90 dias, comparados para cada cepa.



Médias seguidas de letras diferentes maiúsculas e minúsculas são significativamente diferentes pelo de teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2021).

Estudos mostraram que, durante o armazenamento, as viabilidades de bactérias probióticas microencapsuladas foram preservadas em temperaturas de refrigeração (CHÁVARRI *et al.*, 2010; DE ANDRADE *et al.*, 2019; POLETTO *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2008). A viabilidade das bactérias microencapsuladas poderá ser mantida no armazenamento em baixas temperaturas que as mantêm em estado latente, evita o rearranjo da parede do material e a exposição inadequada desses microrganismos (ALBERTINI *et al.*, 2010; DE ANDRADE *et al.*, 2019).

4 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que a utilização do método de gelificação iônica externa com atomização por ar pressurizado, com bico tipo *spray* duplo fluido do equipamento Spray Dryer, apresentou alta eficiência de microencapsulação e produziu microesferas probióticas com tamanhos, características morfológicas e contagens de células viáveis, adequadas para a entrega de bactérias probióticas em matrizes alimentares pastosas. O aprisionamento de células de *L. acidophilus* e *L. paracasei* em microesferas de alginato de cálcio, sem a aplicação de técnicas adicionais de secagem, forneceu proteção às cepas sob condições gastrointestinais simuladas, à ação do calor durante tratamentos térmicos e no período de armazenamento por 90 dias a temperatura de 4 °C. Dessa forma, os resultados obtidos sustentam a utilização dessa técnica em novos estudos que visam aplicar *L. acidophilus* e *L. paracasei* em matrizes alimentares pastosas, sem prováveis prejuízos à qualidade sensorial do produto e com a presença de quantidades de bactérias viáveis necessárias para prover alegações funcionais ou de saúde.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências brasileiras de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n.º 241, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 27 jul. 2018.

AGUILAR, K. C. *et al.* Protein adsorption onto alginate-pectin microparticles and films produced by ionic gelation. **Journal of Food Engineering**, [Oxford], v. 154, n. 2, p. 17–24, June 2015. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201900093103>. Acesso em: 02 fev. 2021.

AHIRRAO, S. P. *et al.* Iontropic gelation: A promising cross linking technique for hydrogels. **Research and Reviews: Journal of Pharmaceutics and Nanotechnology**, [Dubai], v. 2, n. 1, p. 1-6, Jan./Mar. 2014. Disponível em: <https://www.rroij.com/open-access/ionotropic-gelation-a-promising-cross-linking-technique-for-hydrogels-1-6.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2021.

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 Chemistry**, [Oxford], v. 104, n. 1, p. 93–99, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814606008661>. Acesso em: 08 set. 2021.

ALBERTINI, B. *et al.* Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [Amsterdam], v. 40, n. 4, p. 359–366, July 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0928098710001569>. Acesso em: 05 jan. 2021.

ANEKELLA, K.; ORSAT, V. Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 50, n. 1, p. 17–24, Jan. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643812003313>. Acesso em: 20 jan. 2021.

BALLUS, C. A. *et al.* Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na elaboração de produtos lácteos fermentados: Revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, [Curitiba], v. 28, n. 1, p. 85-96, jan./jun. 2010. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/enfermeria/resource/pt/lil-570193>. Acesso em: 03 jun. 2021.

BOSNEA, L. A.; MOSCHAKIS, T.; BILIADERIS, C. G. Complex Coacervation as a Novel Microencapsulation Technique to Improve Viability of Probiotics Under Different Stresses. **Food and Bioprocess Technology**, [Nova York], v. 7, n. 10, p. 2767–2781, Apr. 2014. Disponível em: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/817786>. Acesso em: 26 fev. 2021.

CAVALHEIRO, C. *et al.* Survival of probiotic *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecium* in alginate beads during stress treatments. **Nutrition & Food Science**, [Bingley], v. 49, n. 2, p. 273–283, Mar. 2019. Disponível em: <https://www.emerald.com/insight/content/doi/10.1108/NFS-05-2018-0132/full/html?skipTracking=true>. Acesso em: 23 maio 2021.

CHAMPAGNE, C. P. *et al.* Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 149, n. 3, p. 185–193, Oct. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160511003795>. Acesso em: 02 jan. 2021.

CHANDRAMOULI, V. *et al.* An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus spp.* in simulated gastric conditions. **Journal of Microbiological Methods**, [Netherlands], v. 56, n. 1, p. 27–35, Jan. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14706748/>. Acesso em: 21 set. 2021.

CHÁVARRI, M. *et al.* Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 142, n. 1–2, p. 185–189, Aug. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20659775/>. Acesso em: 09 fev. 2021.

CHRISTIANSEN, P. *et al.* Heat resistance of *Lactobacillus paracasei* isolated from semi-hard cheese made of pasteurised milk. **International Dairy Journal**, [Wageningen], v. 16, n. 10, p. 1196–1204, Oct. 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694605002360>. Acesso em: 15 jan. 2021.

CHUN, H.; KIM, C-H.; CHO, Y-H. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* DKL 109 using external ionic gelation method. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, [Coreia], v. 34, n. 5, p. 692–699, Oct. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4662232/>. Acesso em: 12 out. 2021.

COOK, M. T. *et al.* Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, [Toronto], v. 162, n. 1, p. 56–67, Aug. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168365912004968>. Acesso em: 12 nov. 2021.

CROW, V. *et al.* Raw milk flora and NSLAB as adjuncts. **Australian Journal of Dairy Technology**, [Melbourne], v. 57, n. 2, p. 99–105, July 2002. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/279892191_Raw_milk_flora_and_NSLAB_as_adjunct. Acesso em: 05 fev. 2021.

DE ANDRADE, D. P. *et al.* Stability of microencapsulated lactic acid bacteria under acidic and bile juice conditions. **International Journal of Food Science and Technology**, [Malden], v. 54, n. 7, p. 2355–2362, July 2019. Disponível em: <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ijfs.14114>. Acesso em: 06 jan. 2021.

DEL PIANO, M. *et al.* Is microencapsulation the future of probiotic preparations? The increased efficacy of gastro-protected probiotics. **Gut Microbes**, [Filadélfia], v. 2, n. 2, p. 120–123, Apr. 2011. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/gmic.2.2.15784>. Acesso em: 25 jan. 2021.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. **Journal of Applied Bacteriology**, [Hoboken], v. 23, n. 1, p. 130–135, Apr. 1960. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>. Acesso em: 02 fev. 2021.

DE MATOS-JÚNIOR, F. E. *et al.* Evaluation of the viability and the preservation of the functionality of microencapsulated *Lactobacillus paracasei* BGP1 and *Lactobacillus rhamnosus* 64 in lipid particles coated by polymer electrostatic interaction. **Journal of Functional Foods**, [Roma], v. 54, p. 98–108, Mar. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464619300064>. Acesso em: 24 jan. 2021.

DEL RE, B. *et al.* Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. **Letters in Applied Microbiology**, [Oxford], v. 31, n. 6, p. 438–442, July 2008. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x>. Acesso em: 02 jan. 2021.

DING, W. K.; SHAH, N. P. Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. **Journal of Food Science**, [Chicago], v. 72, n. 9, p. 446–450, Dec. 2007. Disponível em: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/714723>. Acesso em: 02 jan. 2021.

DING, W. K.; SHAH, N. P. An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. **Journal of Food Science**, [Chicago], v. 74, n. 2, p. M53-M61, Mar. 2009. Disponível em: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1750-3841.2008.01030.x>. Acesso em: 18 jan. 2021.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. Probióticos em alimentos. **Propriedades nutricionais e de saúde e diretrizes para avaliação**. FAO Food and Nutrition Paper, v. 85, 2006. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>. Acesso em: 4 out. 2021.

FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, 2002. **Report of a joint FAO/WHO working group**. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002. p. 1–11. Disponível em: https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf. Acesso em: 12 nov. 2021.

FARIAS, T. G. S. de *et al.* Viabilities of *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290 and *Lactobacillus casei* ATCC 334 (in free form or encapsulated with calcium alginate-chitosan) in yellow mombin ice cream. **LWT - Food Science and Technology**, [Oxford], v. 100, p. 391–396, Feb. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643818309307>. Acesso em: 05 jan. 2021.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, [Lavras], v. 35, n. 6, p. 1039–1042, Dec. 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cagro/a/yjKLJXN9KysfmX6rvL93TSh>. Acesso em: 03 jan. 2021.

GBASSI, G. K. *et al.* Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 129, n. 1, p. 103–105, Jan. 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160508006090>. Acesso em: 30 jan. 2021.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. **Journal of Controlled Release**, [Toronto], v. 114, n. 1, p. 1–14, Aug. 2006. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016836590600201X>. Acesso em: 10 jan. 2021.

GROSSO, C. R. F.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yoghurt. **Brazilian Journal of Microbiology**, [São Paulo], v. 35, p. 151–156, June 2004. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/bjm/a/WrCMVT5MZZw3QVXxgjrNcGk/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 09 jan. 2021.

HANSEN, L. T. *et al.* Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 19, n. 1, p. 35–45, Feb. 2002. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002001904526>. Acesso em: 01 out. 2021.

HILL, C. *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [Amsterdam], v. 11, p. 506–514, June 2014. Disponível em:

<https://www.nature.com/articles/nrgastro.2014.66>. Acesso em: 12 nov. 2021.

HOMAYOUNI, A. *et al.* Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 111, n. 1, p. 50–55, Nov. 2008. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814608003245>. Acesso em: 12 jun. 2021.

JOHN, R. P. *et al.* Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. **Critical Reviews in Biotechnology**, [Amsterdam], v. 31, n. 3, p. 211–226, Sept. 2011. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20879835/>. Acesso em: 02 jan. 2021.

KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. **LWT - Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 39, n. 10, p. 1221–1227, Dec. 2006. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643805001660>. Acesso em: 12 fev. 2021.

KOURKOUTAS, Y. *et al.* Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review. **Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 21, n. 4, p. 377–397, Aug. 2004. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002003001072>. Acesso em: 01 jan. 2021.

- LI, C. *et al.* Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG by Transglutaminase Cross-Linked Soy Protein Isolate to Improve Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions and Yoghurt. **Journal of Food Science**, [Chicago], v. 81, n. 7, p. M1726–M1734, July 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27228279/>. Acesso em: 12 fev. 2021.
- LUYER, M. D. *et al.* Strain-Specific effects of probiotics on gut barrier integrity following hemorrhagic shock. **Infection and Immunity**, [Davis], v. 73, n. 6, p. 3686–3692, June 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1111872/>. Acesso em: 10 nov. 2021.
- MANDAL, S.; PUNIYA, A. K.; SINGH, K. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. **International Dairy Journal**, [Wageningen], v. 16, n. 10, p. 1190–1195, Oct. 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694605002098>. Acesso em: 12 jan. 2021.
- MIZOCK, B. A. Probiotics. **Disease-a-Month**, [Chicago], v. 61, n. 7, p. 259–290, Apr. 2015. Disponível em: <https://europepmc.org/article/MED/25921792>. Acesso em: 12 nov. 2021.
- PARK, J. K.; CHANG, H. N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology Advances**, [Amsterdam], v. 18, n. 4, p. 303–319, July 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975000000409>. Acesso em: 28 jan. 2021.
- PATIL, J. S. *et al.* 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**, [Madrid], v. 5, n. 1, p. 241–248, Mar. 2010. Disponível em: https://chalcogen.ro/241_Patil.pdf. Acesso em: 15 jan. 2021.
- PERIAGO, P. M.; ABEE, T.; WOUTERS, J. A. Analysis of the heat-adaptive response of psychrotrophic *Bacillus weihenstephanensis*. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 15, n. 79, p. 17–26, Nov. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12382681/>. Acesso em: 12 fev. 2021.
- PICOT, A.; LACROIX, C. Encapsulation of *Bifidobacteria* in whey protein-based microcapsules and survival in stimulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal**, [Wageningen], v. 14, n. 6, p. 505–515, June 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694603002450>. Acesso em: 14 out. 2021.
- POLETTI, G. *et al.* Study of viability and storage stability of *Lactobacillus acidophilus* when encapsulated with the prebiotics rice bran, inulin and Hi-maize. **Food Hydrocolloids**, [Oxford], v. 95, p. 238–244, Oct. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X18322318>. Acesso em: 04 jan. 2021.

RATHORE, S. *et al.* Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, [Oxford], v. 116, n. 2, p. 369–381, May 2013. Disponível em: <https://scholarbank.nus.edu.sg/handle/10635/106677>. Acesso em: 12 nov. 2021.

REIS, C. P. *et al.* Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. **Journal of Microencapsulation**, [London], v. 23, n. 3, p. 245–257, May 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16801237/>. Acesso em: 14 fev. 2021.

REZAAE, A.; GODINI, H.; BAKHTOU, H. Microbial cellulose as support material for the immobilization of denitrifying bacteria. **Environmental Engineering and Management Journal**, [Oxford], v. 7, n. 5, p. 589–594, Sept. 2008. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/237675867_Microbial_cellulose_as_support_material_for_the_immobilization_of_denitrifying_bacteria. Acesso em: 02 fev. 2021.

RIBEIRO, M. C. E. *et al.* Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 66, p. 424–431, Dec. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996914006656>. Acesso em: 02 jan. 2021.

SCHOUBBEN, A. *et al.* Development of a scalable procedure for fine calcium alginate particle preparation. **Chemical Engineering Journal**, [Amsterdam], v. 160, n. 1, p. 363–369, May 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1385894710002068>. Acesso em: 5 jan. 2021.

SEYEDAIN-ARDABILI, M.; SHARIFAN, A.; TARZI, B. G. The production of synbiotic bread by microencapsulation. **Food Technology and Biotechnology**, [Croácia], v. 54, n. 1, p. 52–59, Mar. 2016. Disponível em: <https://europepmc.org/article/MED/27904393>. Acesso em: 11 jan. 2021.

SHAHARUDDIN, S.; MUHAMAD, I. I. Microencapsulation of alginate-immobilized bagasse with *Lactobacillus rhamnosus* NRRL 442: Enhancement of survivability and themotolerance. **Carbohydrate Polymers**, [Oxford], v. 119, n. 30, p. 173–181, Mar. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861714011588>. Acesso em: 20 jan. 2021.

SILVA, K. C. G. *et al.* Symbiotic microencapsulation to enhance *Lactobacillus acidophilus* survival. **LWT - Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 89, p. 503–509, Mar. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817308459>. Acesso em: 12 jun. 2021.

SOLANKI, H. K. *et al.* Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. **BioMed Research International**, [Cairo], v. 2013, n. 5, p. 620719, Aug. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3763591/>. Acesso em: 26 jan. 2021.

SOUSA, S. *et al.* Characterization of freezing effect upon stability of, probiotic loaded, calcium-alginate microparticles. **Food and Bioproducts Processing**, [Londres], v. 93, p. 90–97, Jan. 2015. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960308513001259>. Acesso em: 20 fev. 2021.

TEIXEIRA, M. A. **Influência da adição de biopolímeros e de diferentes técnicas de gotejamento na encapsulação de alfa-tocoferol por gelificação iônica**. 2021. 96 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Biomateriais) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2021.

TERPOU, A. *et al.* Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. **Nutrients**, [Basileia], v. 11, n. 7, p. 1-32, July 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/7/1591>. Acesso em: 01 fev. 2021.

XIAO, Y. *et al.* Layer (whey protein isolate)-by-layer (xanthan gum) microencapsulation enhances survivability of *L. bulgaricus* and *L. paracasei* under simulated gastrointestinal juice and thermal conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, [Amsterdam], v. 148, p. 238-247, Apr. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31935402/>. Acesso em: 10 nov. 2021.

YANG, J. *et al.* Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, [Oxford], v. 123, p. 53–66, June 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861715000533>. Acesso em: 03 jan. 2021.

YEUNG, T. W. *et al.* Microencapsulation of probiotics in hydrogel particles: Enhancing: *Lactococcus lactis subsp. cremoris* LM0230 viability using calcium alginate beads. **Food and Function**, [Londres], v. 7, n. 4, p. 1797–1804, Apr. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26611443/>. Acesso em: 29 jan. 2021.

ZHAO, R. *et al.* Measurement of particle diameter of *Lactobacillus acidophilus* microcapsule by spray drying and analysis on its microstructure. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [Berlim], v. 24, n. 8, p. 1349–1354, Nov. 2008. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-007-9615-0>. Acesso em: 22 jan. 2021.

**ARTIGO 2 – DOCES DE LEITE COM CAFÉ ADICIONADOS DE *L. PARACASEI*:
CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO E
SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL**

Norma NBR 6022 (ABNT, 2018).

RESUMO

O objetivo do estudo foi a aplicação de *L. paracasei*, microencapsulados pela técnica de gelificação iônica com atomização por ar pressurizado em doces de leite com café, caracterizar os doces e avaliar a viabilidade do probiótico durante o armazenamento por 90 dias e durante a simulação gastrointestinal. Foram elaborados doces de leite convencional e *light* com café. O doce de leite *light* apresentou redução de 19,3% nos teores de açúcares totais e de 37,0% nos teores de gorduras. As adições das microesferas não influenciaram significativamente na textura dos doces de leite com café. Os doces de leite adicionados de microesferas apresentaram coloração mais clara. O padrão microbiológico para coliformes totais, *Salmonella* sp., *Staphylococcus coagulase* positiva e fungos e leveduras dos doces de leite atenderam aos requisitos da legislação. A adição das microesferas nos doces de leite não influenciou significativamente na textura dos doces. Todos os doces que receberam as microesferas apresentaram coloração mais clara e o parâmetro L* das amostras avaliadas foram elevados. As contagens de *L. paracasei* inicial nos doces de leite com café foram em média de 8,28 log UFC/g e uma porção (20 g) forneceria $3,8 \times 10^9$ UFC de *L. paracasei*. Ao término do tempo de vida útil do produto, os doces de leite com café convencional ou *light* com células microencapsuladas forneceria em média $2,7 \times 10^8$ UFC/porção de *L. paracasei* e a viabilidade foi mantida na quantidade preconizada de $10^9 - 10^8$ UFC/porção. As células livres e microencapsuladas foram testadas em condições gastrointestinais e ao término do período de armazenamento as células microencapsuladas em doce convencional ou *light* tiveram suas viabilidades mantidas em média de 6,50 log UFC/g e uma colher forneceria $6,3 \times 10^7$ UFC de *L. paracasei*, quantidade suficiente para alegação de produto funcional após incubação em condições adversas do trato gastrointestinal. Foi possível desenvolver uma sobremesa com alegação de produto funcional e com redução de gorduras e açúcares e vida de prateleira de 90 dias.

Palavras-chave: *L. paracasei*. Composição química. Composição físico-química. Doce de leite *light* com café.

1 INTRODUÇÃO

O doce de leite é um produto que conquistou o mercado por apresentar textura lisa, macia e sabor legítimo, agradável e muitas vezes afetivo.

O aumento da demanda por produtos mais saudáveis é uma tendência mundial e a indústria laticista deve enxergar nesse mercado uma possibilidade de criação e desenvolvimento de novos produtos, diferenciados e com maior valor agregado (DA SILVA, 2016).

A tendência é que produtos tradicionais venham a ser substituídos por produtos das linhas *light*, *diet* e funcional e mantenham as suas características originais de textura, sabor e aroma (GUIMARÃES *et al.*, 2012).

A adição do café como ingrediente do doce de leite é vista como uma forma de proporcionar ao doce de leite um sabor agradável, diferenciado, menos adocicado e mais saboroso. Além disso, esse alimento é rico em fibras solúveis, compostos antioxidantes e de várias outras substâncias biologicamente ativas que exercem benefícios à saúde, como os ácidos clorogênicos, trigonelina e cafeína (ABRAHÃO *et al.*, 2010). Atualmente, devido aos benefícios conferidos ao seu consumo, a comunidade científica o considera como bebida funcional ou mesmo nutracêutica (GUIMARÃES *et al.*, 2012).

Guimarães *et al.* (2012) desenvolveram formulações de doce de leite com café com diferentes níveis de polidextrose e sucralose, com baixo teor calórico e propriedades funcionais. Foi observado que a substituição do açúcar não influenciou significativamente nas características tecnológicas desejáveis do doce de leite, mas melhoraram a qualidade nutricional do produto.

Os alimentos funcionais promovem efeitos benéficos em uma ou mais funções do organismo e, de acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e a Organização Mundial da Saúde (FAO/OMS, 2001), os probióticos podem ser definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro”.

Os benefícios como correção do desequilíbrio da microbiota intestinal, dificultar a aderência de patógenos entéricos, efeitos anti-inflamatórios e antimicrobianos, só podem ser alcançados se as cepas probióticas estiverem presentes concentrações mínimas de 10^8 - 10^9 UFC/recomendação diária do produto ou 10^6 - 10^7 UFC/mL ou g do alimento (ANVISA 2018, CHÁVARRI *et al.*, 2010; SOUSA *et al.*, 2015).

Probióticos são incorporados a uma ampla variedade de alimentos, incluindo produtos lácteos (como iogurte, queijo, sorvete, sobremesas lácteas), mas também em produtos não lácteos (como chocolate, cereais, sucos) (ANAL; SINGH, 2007). Simeoni (2015) desenvolveu um doce de leite *light* com adição do probiótico *Enterococcus faecium* microencapsulado e conseguiu conferir resistência e viabilidade às células probióticas até o final da vida de prateleira do produto.

No entanto, a viabilidade das cepas probióticas pode ser limitada por estresses ambientais, como presença de oxigênio, danos mecânicos, altas temperaturas de processamento e armazenamento, interação com alimentos aos quais são adicionados e eles devem sobreviver às condições adversas encontradas no trato gastrointestinal, para promover efeitos benéficos à saúde (SILVA *et al.*, 2018; GARCÍA-CEJA *et al.*, 2015; KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2004). No entanto, a maioria das cepas probióticas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* não são capazes de cumprir os requisitos supracitados acima.

A microencapsulação é uma técnica promissora para proteção de cepas e vários estudos têm sido desenvolvidos investigando o uso da técnica contra condições adversas às quais essas bactérias podem ser expostas (BRINQUES; AYUB, 2011; DE ANDRADE *et al.*, 2019; DE MATOS-JÚNIOR *et al.*, 2019; GUL, 2017; SILVA *et al.*, 2018).

O consumo do doce de leite faz parte do hábito alimentar dos brasileiros e atender a demanda por alimentos mais saudáveis, com teores de açúcares e gorduras reduzidos, adicionados de probióticos vivos e viáveis, pode apresentar uma alternativa viável para os consumidores que se preocupam com a saudabilidade. A microencapsulação por gelificação iônica externa é utilizada para manter a viabilidade de cepas probióticas durante o armazenamento de produtos e durante a passagem pelo trato gastrointestinal, além disso é capaz de produzir microesferas probióticas gelatinosas e com características compatíveis com a matriz doce de leite com café. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi desenvolver doces de leite convencional e *light* (reduzido em gorduras) com café para a entrega de *L. paracasei* microencapsulados, avaliar as características físico-químicas, físicas e microbiológicas dos doces de leite com café produzidos e a viabilidade da cepa microencapsulada durante 90 dias de armazenamento e às condições gastrointestinais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matérias-primas utilizadas na fabricação dos doces

Foram utilizados leite em pó integral, leite em pó semidesnatado, água potável, sacarose (União, Araras, Brasil), sucralose (Linea, São Paulo, Brasil), amido de milho modificado Amidogem 8500 (Gemacom Tech, Juiz de Fora, Brasil), citrato de sódio anidro (Synth, Diadema, Brasil), sorbato de potássio (Dinâmica Química Contemporânea LTDA, Indaiatuba, Brasil), bicarbonato de sódio (Farmax, Divinópolis, Brasil), café solúvel e células livres e microencapsuladas de *L. paracasei*. O microrganismo utilizado foi *Lactobacillus paracasei subsp paracasei* (LBC81) (LBC) (Danisco Dupont, Cotia, São Paulo, Brasil).

2.2 Avaliação físico-química do leite

Os leites em pó integral e semidesnatado foram avaliados pela determinação da acidez titulável, teor de umidade, gordura e proteínas de acordo com os métodos oficiais físico-químicos de referência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, descritos na Instrução Normativa nº 53, de 1º de outubro de 2018, em triplicata (BRASIL, 2018). A acidez titulável (ml NaOH 0,1 N/10 g sólidos não gordurosos) foi determinada pela titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 N e solução alcoólica de fenolftaleína a 1% (m/v), o teor de umidade (%) foi determinado por gravimetria através da secagem em estufa a 87 °C por 5 horas, o teor de gordura na matéria integral (%) pelo método butirométrico de Gerber e o teor de proteína no extrato seco desengordurado pelo método de Kjeldahl pela quantificação do nitrogênio, utilizando o fator de conversão 6,38.

2.3 Produção das microesferas probióticas

2.3.1 Ativação e propagação da cultura probiótica

A ativação de *L. paracasei* e a propagação da cultura probiótica (conforme a curva de crescimento) foi realizada utilizando a mesma metodologia citada anteriormente no Artigo 1. Após

a propagação da cultura probiótica, o sobrenadante foi descartado e as células de *L. paracasei* foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS: 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 150 mM NaCl, pH 7). O sedimento celular obtido foi utilizado na microencapsulação e para a realização dos experimentos de células livres os probióticos foram cultivados nas mesmas condições e ressuspensos em água peptonada 0,1% (p.v⁻¹).

2.3.2 Microencapsulação de *L. paracasei*, viabilidade e eficiência de encapsulação

As microesferas foram produzidas por microencapsulação através da técnica de gelificação iônica externa com atomização por ar pressurizado utilizando o bico pressurizado tipo *spray* duplo fluido do equipamento Spray Dryer, de acordo com a metodologia proposta por Teixeira (2021), com adaptações. A viabilidade e a eficiência de encapsulação foram realizadas utilizando a mesma metodologia descrita no Artigo 1.

2.3.3 Caracterização das microesferas

A umidade das microesferas foi determinada através da leitura direta em balança determinadora de umidade (Shimadzu, modelo MOC63u, Quioto, Japão) e a atividade de água em analisador de atividade de água por ponto de orvalho (Meter, modelo Aqualab 4TE, São José dos Campos, Brasil).

2.4 Caracterização química e físico-química do café solúvel

A caracterização da amostra foi realizada conforme as metodologias sugeridas pela AOAC (2007). Os teores de proteínas totais foram obtidos pelo método de Kjeldahl, com fator de 6,25. Na quantificação dos lipídeos foi utilizado o método de extração contínua em aparelho de “Soxhlet”, utilizando-se como solvente o éter. Os minerais foram quantificados pela calcinação da amostra em mufla a 550 °C. A umidade foi determinada através da leitura direta em balança determinadora de umidade (Shimadzu, modelo MOC63u, Quioto, Japão) e a acidez por titulação com NaOH 0,1 N a partir da agitação de 2 g de café solúvel com 50 mL de água destilada e os resultados foram

expressos em mL de NaOH 0,1 N por 100 g de amostra. O pH foi avaliado pela leitura em pHmetro (Tecnal, São Paulo, Brasil).

2.4.1 Fibra dietética solúvel

A análise da fibra dietética solúvel foi realizada no café solúvel conforme o método proposto pela AOAC (2007) utilizando o kit TDF-100A (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), com modificações. Foram pesadas 6 repetições de 1 g de café solúvel às quais foram adicionados 50 mL de tampão fosfato (pH 6). A digestão foi realizada em condições específicas (temperatura, tempo e pH) descritas pelo método para as enzimas α -amilase, protease e amiloglucosidase. Após a digestão, as amostras foram filtradas a vácuo em cadinhos secos com celite. O resíduo líquido proveniente da primeira filtração foi lavado duas vezes com 15 mL de etanol 95% e duas vezes com 15 mL de acetona e novamente filtrados. Três cadinhos com os resíduos sólidos da fibra insolúvel (segunda filtração) foram secos em estufa a 100 °C por 12 horas, pesados e utilizados para a determinação das cinzas e proteínas. Ao resíduo líquido dessa etapa foram adicionados etanol 95% a 60 °C em volume equivalente a 4 vezes ao volume do filtrado. Após 1 hora de repouso, foi novamente filtrado em cadinho com celite, transferindo quantitativamente todo o resíduo para a filtração usando etanol 95%. Os três cadinhos que restaram foram secos, pesados e utilizados para a determinação de proteína e cinzas. A determinação do teor de cinzas foi realizada conforme o método proposto pela AOAC (2007) e a análise de proteína foi realizada pela determinação do conteúdo de nitrogênio x 6,25. A quantificação do teor de nitrogênio foi realizada conforme o método de Kjeldahl. O cálculo do teor de fibra solúvel (FDS) foi realizado conforme descrito pela AOAC (2007), de acordo com a Equação 1.

$$\text{FDS (\%)} = \{[(F1 + F2)/2] - P - C - B / [(M1 + M2)/2] \} \times 100 \quad (1)$$

Em que F1 e F2 são as médias das massas dos resíduos (mg) da primeira e segunda filtrações; P e C são as médias das massas (mg) de proteínas e cinzas, respectivamente, determinados no primeiro e segundo resíduos das filtrações; B é a massa (mg) do branco e; M1 e M2 são as massas (mg) das amostras.

2.4.2 Cafeína

A quantificação da cafeína foi realizada de acordo com o método do Instituto Adolfo Lutz (1985), em triplicata. Foram homogeneizados 1 g do café solúvel com 4 mL de ácido sulfúrico. Após, foram adicionados às amostras 50 mL de água destilada quente (80 °C) e as mesmas foram transferidas para o banho-maria a 80 °C por 30 minutos. As amostras foram filtradas em papel filtro úmido e depois foram transferidas para um funil de separação de 500 mL e o béquer contendo resíduos da amostra foi lavado com 3 porções de 10 mL de água quente. Após resfriamento das amostras foram adicionados 30 mL de clorofórmio e a fase apolar foi recolhida em balão de 300 mL. A extração foi repetida com mais três alíquotas de 30 mL de clorofórmio. O clorofórmio foi evaporado do extrato em rotavapor e o resíduo foi lavado com água quente, filtrado e o volume completo para 1000 mL com água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 274 nm e a quantificação da cafeína foi realizada através da curva padrão.

2.4.3 Compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante

O café solúvel foi avaliado quanto à sua capacidade antioxidante através da reação com o cátion ABTS^{•+} e sua capacidade de eliminar os radicais livres DPPH, em triplicata. O conteúdo total de compostos fenólicos (Folin-Ciocalteu) também foi determinado de acordo com o método de Singleton e Rossi (1965) com adaptações sugeridas por Bravo *et al.* (2012). O café solúvel foi diluído (1 g : 10 mL) em água destilada e 100 µL foram transferidos para tubos de ensaio embalados com papel alumínio onde foram adicionados 7,9 mL de água destilada e 500 µL do reagente Folin-Ciocalteu (Vetec, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Após 2 minutos, foram adicionados a mistura 1,5 mL de solução de carbonato de sódio a 7,5%. Os tubos contendo as amostras foram imediatamente tampados com papel alumínio e armazenados em temperatura ambiente ao abrigo da luz por 90 minutos. Após o período de repouso foram realizadas as leituras das absorbâncias a 765 nm em espectrofotômetro digital (Biospectro SP22, Curitiba, Brasil). A curva padrão de ácido gálico (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) foi utilizada como referência e os resultados foram expressos em miligramas de ácido gálico por grama de café solúvel (g de GA/100 g de café solúvel).

A capacidade antioxidante por ensaio ABTS do café solúvel foi realizada de acordo com a metodologia sugerida por Sánchez-gonzález, Jiménez-Escrig e Saura-Calixto (2005) com adaptações de Vignoli, Bassoli e Benassi (2011), em triplicata. Para produção do cátion ABTS^{•+}, reagiu-se a solução de 2,2'-AZINO - BIS (3-ethylbenzothiazonile-6- sulfonic acid) diammonium salt (ABTS, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) 7 mM.L⁻¹ com a solução de persulfato de potássio 2,45 mM.L⁻¹ e o reagente foi mantido no escuro por 16 horas antes do uso. A solução de ABTS^{•+} foi diluída com solução salina tamponada com fosfato 5 mM (pH 7,4) para uma absorvância de 0,70 ± 0,02 a 730 nm. O café solúvel foi diluído em 3 g : 100 mL de água destilada e foram tomados 10 µL para a determinação. Após 6 minutos da adição de 4 mL da solução de ABTS^{•+} às amostras, as leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro digital (Biospectro SP22, Curitiba, Brasil). A curva-padrão foi realizada a partir da solução etílica padrão de 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (Trolox, Merk, Darmstadt, Germany). A capacidade antioxidante foi expressa em g Trolox / 100 g de café solúvel (matéria integral).

Para avaliar a capacidade antioxidante por ensaio DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi utilizada a metodologia descrita por Casagrande *et al.* (2007) com adaptações sugeridas por Vignoli, Bassoli e Benassi (2011). Foram preparadas diluições do café solúvel em água destilada (2, 3, 4, 6, 10 e 15 mg / mL). Foram tomados das diluições 10 µL aos quais foram adicionados: 1 mL de tampão de acetato a 100 mM (pH 5.5); 1 mL de etanol e; 0,5 mL de DPPH etanólico 250 µM. Após 10 minutos, foi realizada a medida da absorvância em 517 nm. Um controle positivo foi preparado representando a quantidade máxima de DPPH para calcular a capacidade de doação de hidrogênio do café solúvel. O IC50 (a concentração da substância que proporciona redução de 50% da concentração de radicais livres) foi determinado utilizando a Equação 2, na qual IA é porcentagem de inibição da atividade do radical livre.

$$IA (\%) = 100 - (Abs \text{ da amostra} / Abs \text{ do controle}) \times 100 \quad (2)$$

2.5 Formulação dos doces de leite

Foram elaboradas duas formulações de doce de leite (TABELA 1): doce de leite convencional com café e doce de leite *light* com café. O doce de leite *light* foi elaborado com leite reconstituído semidesnatado e com a substituição parcial da sacarose em 40% (m/m) pelo edulcorante de alta intensidade sucralose, a quantidade utilizada foi calculada de acordo com o

poder edulcorante da marca comercial utilizada (10 vezes), com equivalência à concentração de 8% (m/m) de sacarose.

Tabela 1 – Formulações elaboradas de doce de leite com café.

Formulações	Probiótico adicionado	Codificação utilizada
Doce de leite com café convencional	<i>Lactobacillus paracasei</i> células livres	DCPL
Doce de leite com café convencional	<i>Lactobacillus paracasei</i> células microencapsuladas	DCPM
Doce de leite <i>light</i> com café	<i>Lactobacillus paracasei</i> células livres	DLPL
Doce de leite <i>light</i> com café	<i>Lactobacillus paracasei</i> células microencapsuladas	DLPM

Fonte: Da autora (2021).

Os leites integral e semidesnatado foram reconstituídos nas proporções estabelecidas pelos fabricantes. O amido de milho modificado foi utilizado na fabricação dos doces de leite, conforme o sugerido por Rocha *et al.* (2017), para auxiliar no controle da cristalização da lactose e a quantidade de café solúvel foi adicionada conforme também o sugerido por Rocha *et al.* (2017) como a concentração mais aceita pelos provadores na análise sensorial.

Aos doces elaborados de cada formulação foram adicionadas microesferas de alginato de cálcio contendo $9,87 \pm 0,26$ log UFC/g de *L. paracasei* ou células livres de *L. paracasei*, em proporções descritas na Tabela 2. As quantidades de microesferas e células livres adicionadas aos doces foram calculadas de acordo com as contagens de células viáveis nas microesferas e as concentrações de bactérias viáveis desejadas nos doces prontos.

Os cálculos dos ingredientes dos doces de leite com café foram realizados em relação aos volumes dos leites prontos, já reconstituídos.

Tabela 2 - Formulações dos doces de leite convencional e *light* com café.

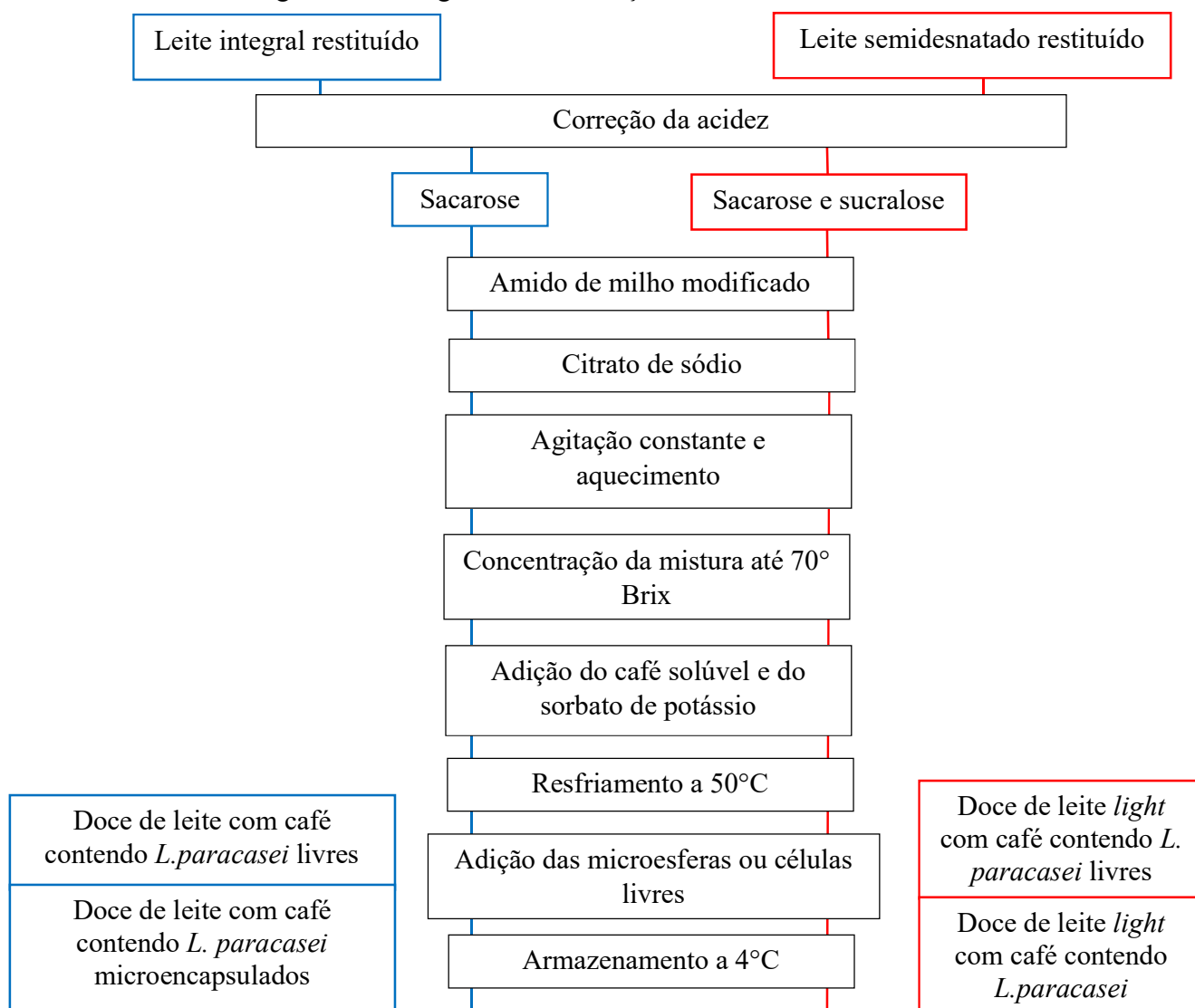
Ingredientes (%)	Convencional	Convencional	<i>Light</i>	<i>Light</i>
	células livres	microesferas	células livres	microesferas
Leite reconstituído integral (g)	100	100	-	-
Leite reconstituído semidesnatado (g)	-	-	100	100
Sacarose (g)	20,0	20,0	12,0	12,0
Sucralose (g)	-	-	0,8	0,8
Amido (g)	0,5	0,5	1,0	1,0
Café solúvel (g)	1,0	1,0	1,0	1,0
Suspensão de <i>L. paracasei</i> (mL)	1,0	-	1,0	-
Microesferas (g)	-	1,0	-	1,0
Citrato de sódio (g)	0,08	0,08	0,08	0,08
Sorbato de potássio (g)	0,02	0,02	0,02	0,02

Fonte: Da autora (2021).

2.6 Fabricação dos doces de leite

A produção dos doces de leite foi realizada na Planta Piloto de Processamento de Produtos Vegetais do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras. Os doces de leite foram processados em tacho aberto (Macanuda[®], Joinville, Santa Catarina) com pá giratória vertical. A tecnologia utilizada foi a descrita por Martins e Lopes (1981), com adaptações de Rocha *et al.* (2017) (FIGURA 1).

Figura 1 - Fluxograma de fabricação dos doces de leite com café.



Fonte: Da autora (2021).

Os leites em pó foram reconstituídos e foi realizada a correção da acidez para 1 g de ácido láctico/L⁻¹ de leite (PERRONE; FERRUA; ABREU, 2006) com a adição de bicarbonato de sódio. Após, o leite preparado foi transferido para o tacho e foram adicionados a sacarose e/ou sucralose, citrato de sódio e o amido de milho modificado, em quantidades estabelecidas para cada formulação, descritas anteriormente na Tabela 2.

Iniciou-se o processo de concentração do doce de leite que foi mantido sob agitação mecânica constante e aquecimento até atingir o teor de sólidos solúveis de 70 °Brix. Atingido o

ponto final, adicionou-se o café solubilizado em água quente na proporção de 1:1 e o sorbato de potássio. A temperatura do tacho permaneceu constante até a homogeneização completa desses ingredientes. Com base nos resultados da avaliação da resistência térmica dos probióticos livres e microencapsulados, foi necessário resfriar o doce até a temperatura de 50 °C para a adição das células livres e microencapsuladas de *L. paracasei*. Os doces depois de resfriados foram pesados e envasados em potes de vidro estéreis de 500 g e os microrganismos foram adicionados e homogeneizados em capela de luxo laminar. Por fim, os doces foram armazenados em temperatura de refrigeração a 4 °C por 90 dias.

2.7 Caracterização dos doces de leite

2.7.1 Rendimento e caracterização físico-química dos doces

A umidade dos doces de leite foi determinada através da leitura direta em balança determinadora de umidade (Shimadzu, modelo MOC63u, Quioto, Japão), a atividade de água em analisador de atividade de água por ponto de orvalho (Meter, modelo Aqualab 4TE, São José dos Campos, Brasil) e a concentração de sólidos solúveis foi determinada através de leitura refratométrica. A determinação da acidez titulável em (% de ácido láctico) foi realizada através de titulação com solução Dornic com indicador fenolftaleína e a gordura pelo método butirométrico de Gerber segundo a metodologia preconizada por Brasil (2006).

Os teores de proteína bruta e resíduo mineral fixo foram determinados segundo as metodologias descritas pela AOAC (2007). A proteína foi quantificada pelo método de Kjeldahl utilizando o fator de conversão 6,38, o resíduo mineral fixo por gravimetria após calcinação a 550 °C. O valor energético foi calculado considerando os fatores de conversão de Atwater, sendo 4 kcal.g⁻¹ para proteínas e carboidratos e 9 kcal.g⁻¹ para lipídios (TORRES *et al.*, 2000).

Os teores de fibra alimentar foram realizados conforme a metodologia descrita no item “2.5.1.1 Fibra dietética solúvel”, com adaptações. O resíduo líquido proveniente da primeira filtração foi lavado quatro vezes com 15 mL de etanol 95% e quatro vezes com 15 mL de acetona e novamente filtrados. Os teores de açúcares totais foram determinados pelo método de Antrona por espectrofotometria com comprimento de onda de 620 nm, conforme Dische (1962).

O rendimento dos doces foi avaliado utilizando-se a Equação 3, proposta por Ferreira *et al.* (2012) e Perrone, Ferrua e Abreu (2006).

$$\text{Rendimento} = \text{MSI/MSD} * 100 \quad (3)$$

Na qual MSI é a matéria seca da mistura dos ingredientes: leite, sacarose/sucralose, citrato, bicarbonato, amido modificado, microesferas e café solúvel e; MSD é a matéria seca do doce.

2.7.2 Caracterização física dos doces

As análises de cor foram realizadas de acordo com Rocha *et al.* (2017) em espectrofotômetro (Konica Minolta®, CM- 5, Osaka, Japão) utilizando os padrões CIElab determinando os valores de luminosidade (L*), intensidade da cor vermelha (a*) e intensidade da cor amarela (b*). A análise do perfil de textura (*texture perfil analysis* - TPA) foi realizada em texturômetro (Stable Micro Systems, TAXT2i, Londres, Inglaterra). Os parâmetros analisados em triplicata foram (SZCZESNIAK, 1963): Dureza (D): força necessária para produzir uma deformação na amostra; Adesividade (A): energia necessária para superar as forças atrativas entre superfície do alimento e a de outros materiais com as quais o alimento está em contato; Elasticidade (E): velocidade na qual um material deformado volta à condição não deformada, depois de removida a força; Coesividade (C): extensão que um material pode ser deformado antes da ruptura e; Gomosidade (G): energia requerida para desintegrar um alimento até estar pronto para a deglutição. Os parâmetros adotados foram (ROCHA *et al.*, 2017): velocidade pré-teste: 2,0 mm.s⁻¹; velocidade teste: 1,0 mm.s⁻¹; velocidade pós-teste: 2,0 mm.s⁻¹; distância: 10,0 mm; tempo: 5,0 s; força de contato: 5,0 g e; probe: cilindro acrílico de 20,0 mm (P20).

2.8 Alterações durante o armazenamento

2.8.1 Atividade de água e acidez titulável

Durante todo tempo de armazenamento por 90 dias, foram realizadas quinzenalmente as análises de atividade de água e acidez titulável dos doces de leite produzidos, conforme a metodologia citada anteriormente no item 2.7.1.

2.8.2 Avaliação microbiológica

A avaliação microbiológica dos doces de leite foi realizada de acordo com os critérios da Portaria n° 354, de 4 de setembro de 1997, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997) e da Resolução RDC n° 331, de 23 de dezembro de 2019 (ANVISA, 2019). Foram realizadas as análises dos doces de leite nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de *Staphylococcus coagulase* positiva, contagem de fungos e leveduras, coliformes totais e *Salmonella* sp. As análises foram realizadas utilizando as metodologias descritas na Instrução Normativa n° 62, de 26 de agosto de 2003, que estabelece os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água (BRASIL, 2003).

2.9 Viabilidade das células livres e microencapsuladas de *L. paracasei* nos doces de leite durante o armazenamento

As viabilidades de *L. paracasei* livres e microencapsulados nos doces de leite convencional e *light* com café foram avaliadas quinzenalmente durante o período de 90 dias de armazenamento em temperatura de 4 °C (DE MATOS-JR *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2014). Em 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias, 1 g dos doces de leite contendo células microencapsuladas foram solubilizados com 9 mL de citrato de sódio 2% (p.v⁻¹) (pH 7,0) estéril e vigorosa agitação em agitador de tubos. A contagem de bactérias viáveis foi realizada através de diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% (p.v⁻¹) seguida de plaqueamento em ágar MRS (Acumedia, San Francisco, EUA), em triplicata (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960). Nos doces contendo as células livres a viabilidade foi analisada utilizando 1 g de amostra homogeneizada em 9 mL de água peptonada 0,1% (p.v⁻¹) seguida de diluições decimais e plaqueamento em ágar MRS.

2.10 Viabilidade das cepas livres e microencapsuladas nos doces de leite em condições gastrointestinais simuladas

Durante o período de armazenamento, nos tempos de 30, 60 e 90 dias, foram realizadas as avaliações da sobrevivência das células livres e microencapsuladas nos doces de leite convencional

e *light* às condições gastrointestinais por simulação *in vitro*. A análise foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Ribeiro *et al.* (2014) e Wang *et al.* (2009) em triplicata, com adaptações.

Na primeira etapa, 5 g dos doces de leite foram incubados em 50 mL do fluido gástrico simulado preparado com 3 g.L⁻¹ de pepsina e 9 g.L⁻¹ de NaCl em água destilada estéril, com ajuste do pH para 2,0 com solução de HCl 1M. As amostras foram incubadas a 37 °C por 2 horas com agitação a 100 rpm em incubadora com agitação orbital. A contagem das bactérias viáveis nos doces foi realizada em 0 e 120 minutos por diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% (p.v⁻¹) e plaqueamento em ágar MRS, após a solubilização do hidrogel com citrato de sódio 2% (p.v⁻¹) (RIBEIRO *et al.*, 2014).

Na segunda etapa, o material resultante da digestão ácida foi recuperado por centrifugação e adicionado no fluido intestinal simulado preparado com 0,95 g.L⁻¹ de pancreatina e 3 g.L⁻¹ de sais biliares Oxgall (Himedia, Mumbai, Índia) com pH ajustado para 7.0 com NaOH 1M. Após 120 minutos de incubação no fluido intestinal a 37 °C sob agitação, as células viáveis foram enumeradas em ágar MRS, da mesma forma como descrito anteriormente.

2.11 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos em média de três repetições. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e diferenças significativas entre os valores das médias foram determinados pelo teste de Scott-Knott com nível de significância de 5%. As análises foram realizadas no *software* Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição físico-química dos leites em pó

De acordo com a Portaria n° 354 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997), que aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Doce de Leite, é permitido a utilização de leite reconstituído (leite em pó) na produção de doce de leite. Na Tabela 1 (MATERIAL SUPLEMENTAR), estão representadas as características físico-químicas dos leites em pó integral e semidesnatado utilizados na produção dos doces e as

estabelecidas pela Instrução Normativa nº 53, de 1º de outubro de 2018, do MAPA (BRASIL, 2018). As análises físico-químicas dos leites em pó utilizados na fabricação dos doces, estão em acordo com o disposto na legislação.

3.2 Viabilidade, eficiência de encapsulação e caracterização das microesferas

A solução de alginato de sódio, adicionada das células livres utilizada na gelificação iônica, apresentou contagem média total de $10,58 \pm 0,11$ log UFC/mL e a eficiência de microencapsulação para a técnica foi de $93,31 \pm 3,30\%$. As microesferas apresentaram contagens médias totais de $9,87 \pm 0,26$ log UFC/g. Considerando o baixo rendimento, geralmente na faixa de 32-50%, dos doces de leite, devido à evaporação da água durante a cocção, a adição da quantidade de 1% de microesferas probióticas nas formulações seriam suficientes para obter contagens próximas de 10^8 UFC/g no doce de leite com café. Outro ponto a ser observado é que a adição dos probióticos que será realizada somente após o término da cocção (redução) e resfriamento dos doces. De acordo com Champagne *et al.* (2011), Charteris *et al.* (1998) e Saad (2006), essas quantidades seriam suficientes para garantir a dose mínima terapêutica recomendada para a manutenção das concentrações de bactérias probióticas viáveis no intestino do consumidor. As microesferas de *L. paracasei* apresentaram teores médios de umidade de $95,95 \pm 0,41\%$ e atividade de água de 0,98. Otárola *et al.* (2016) obtiveram valores médios de umidade superiores (97%) utilizando a mesma técnica para encapsular betalína em matriz de alginato e maltodextrina. Apesar de sua natureza hidrofílica, a capacidade de retenção de água do alginato está diretamente relacionada com sua composição monomérica, condições e técnicas de formação do hidrogel.

3.3 Caracterização do café solúvel

O café solúvel apresentou teor médio de proteína de $12,76 \pm 0,24\%$, e de gordura $0,66 \pm 0,05\%$, valor semelhante ao relatado por Budryn e Nebesny (2013) ($13,70\% - 0,60\%$) para extrato de café (*Coffea canephora*) torrado obtido utilizando a metodologia de 1 g de café para 5,75 mL de água fervente por 10 minutos e posterior liofilização. O teor moderado de acidez encontrado no café solúvel ($308,88 \pm 0,29$ mL de NaOH 1N/100 g), sugere um bom controle da torração dos grãos, visto que a torração excessiva provoca maior degradação do ácido quínico e

consequentemente o aumento da acidez. Observa-se na Tabela 2 (MATERIAL SUPLEMENTAR) que o café solúvel utilizado apresentou composição físico-química semelhante ao estabelecido para o café solúvel dispostos na RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2005), sendo eles: teores de umidade (máximo 5%), resíduo mineral fixo (máximo 14%), pH ($5,0 \pm 0,5$) e cafeína (mínimo 2%). O teor de fibra solúvel foi igual ao relatado por (DÍAZ-RUBIO; SAURA-CALIXTO, 2007), que analisaram vários métodos de extração e encontraram $20,20 \pm 0,90\%$ de fibra solúvel por 100 gramas de café liofilizado.

Gniechwitz *et al.* (2007), utilizando a mesma metodologia de digestão enzimática, quantificaram em uma xícara de café (150 mL), preparada com teor médio de 1,6% de pó, teores médios de 0,5 g de fibra alimentar solúvel. Além disso, comprovaram o efeito prebiótico das fibras solúveis de café liofilizado em estudo *in vivo* que investigou a fermentação desses polissacarídeos pela microbiota fecal humana. Assim como a inulina, as fibras solúveis do café influenciaram positivamente o aumento da população de bactérias do grupo *Bacteroides - Prevotella* e estimularam a produção de ácidos graxos de cadeia curta que desempenham funções fisiológicas benéficas ao organismo, como redução do colesterol, índice glicêmico sanguíneo, risco de doenças cardiovasculares e prevenção do câncer.

3.3.1 Compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante

O ensaio Folin-Ciocalteu pode ser considerado uma avaliação da capacidade antioxidante, pois esse método quantifica o teor de polifenóis com base em uma reação redox (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Observando os resultados representados na Tabela 3 (MATERIAL SUPLEMENTAR) pode-se inferir que o café solúvel utilizado nas formulações dos doces apresentou alto potencial antioxidante. Os resultados são semelhantes aos descritos por Vignoli, Bassoli e Benassi (2011) que avaliaram cafés torra média solúveis e encontraram valores de $13,09 \pm 0,17$ g ácido gálico/100 g, $21,03 \pm 2,25$ g de Trolox/100 g e de $19,87 \pm 1,38$ µg/mL para os ensaios Folin-Ciocalteu, ABTS e DPPH IC₅₀, respectivamente. De acordo com Naidu *et al.* (2008), a extração de compostos antioxidantes do café é barata e segura para a saúde dos consumidores, sendo possível obter preparações secas bastante concentradas de polifenóis sem a necessidade de purificação. Além disso, o café torrado, devido às suas características agradáveis de sabor, apresenta grande potencial para adição em diversas formulações e para prolongar a vida útil desses

produtos alimentícios, especialmente aqueles que contêm quantidades significativas de gordura, suscetíveis à deterioração oxidativa (BUDRYN; NEBESNY, 2013).

3.4 Caracterização dos doces de leite

Na Tabela 3, estão apresentadas as características físico-químicas dos doces de leite com café produzidos. De acordo com Perrone, Ferrua e Abreu (2006), o aumento da acidez, durante o processo produtivo do doce de leite é devido a degradação de moléculas de lactose, concentração, precipitação de sais de cálcio e desfoforilação da caseína. De acordo com a Tabela 3, pode-se observar que as formulações de doces de leite *light* com café apresentaram maiores teores de acidez titulável, o que foi observado por Guimarães *et al.* (2012), em um trabalho que substituiu a sacarose por sucralose e adicionava a polidextrose na elaboração de doce de leite com café.

Todos os doces de leite produzidos apresentaram teores de umidade abaixo do limite máximo estabelecido (30,0%) pela Portaria nº 354, de 04 de setembro de 1997, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que preconiza o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Doce de Leite (BRASIL, 1997). Os resultados obtidos para os teores médios de umidade dos doces de leite *light* com café, 29,46% foram diferentes aos encontrados por Guimarães *et al.* (2012), que encontraram valores máximos de umidade de 21,7%.

Os rendimentos médios de 33,34% dos doces de leite *light* com café foram superiores aos encontrados por Milagres *et al.* (2010), que na produção de doces de leite com substituição total da sacarose por sucralose encontraram 29,0%.

Devido à adição de maiores quantidades de açúcar e à produção com leite integral, os doces de leite convencionais com café apresentaram menores teores médios ($p < 0,05$) de umidade 28,54%, maiores teores médios de rendimento de 45,15% e sólidos solúveis de 67%, em comparação aos doces de leite *light* de café produzidos. Rocha *et al.* (2017) relatam teores médios de umidade de 32%, rendimento de 46,27% e sólidos solúveis de 66% em doces de leite com café, substituindo em 45% o leite por soro lácteo.

Tabela 3 – Composição físico-química dos doces de leite convencional e *light* com café produzidos com adição de probióticos livres e microencapsulados.

Parâmetros	DCPL	DCPM	DLPL	DLPM
Acidez titulável (%)	0,27 ± 0,00b	0,27 ± 0,01b	0,29 ± 0,00a	0,29 ± 0,00a
Rendimento (%)	45,28 ± 0,34a	45,02 ± 0,23a	33,23 ± 0,21b	33,45 ± 0,28b
Umidade (%)	28,63 ± 0,15b	28,46 ± 0,02b	29,47 ± 0,03a	29,45 ± 0,03a
Sólidos solúveis (%)	67,00 ± 0,00a	67,00 ± 0,00a	65,00 ± 0,00b	65,00 ± 0,00b
Aw	0,83 ± 0,02b	0,84 ± 0,01b	0,85 ± 0,01a	0,85 ± 0,08a
Minerais (%)	1,66 ± 0,03b	1,98 ± 0,02a	1,80 ± 0,01b	1,99 ± 0,01a
Proteínas (%)	6,76 ± 0,05b	6,75 ± 0,11b	7,21 ± 0,02a	7,25 ± 0,64a
Gorduras (%)	7,55 ± 0,10a	7,69 ± 0,01a	4,83 ± 0,01b	4,76 ± 0,15b
Fibra solúvel (%)	0,35 ± 0,15b	0,35 ± 0,22b	0,37 ± 0,21a	0,37 ± 0,31a
Valor calórico (kcal.100 g ⁻¹)	315,61 ± 1,29a	315,30 ± 0,49a	297,52 ± 2,05b	296,71 ± 2,60b
Açúcares Totais (%)	53,22 ± 0,16a	53,58 ± 0,39a	42,83 ± 0,29b	43,36 ± 0,48b

DCPL: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* livres; DCPM: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* microencapsulados; DLPL: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* livres e; DLPM: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* microencapsulados. Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$).

Fonte: Da autora (2021).

A atividade de água é uma medida qualitativa da água disponível (livre) no alimento, passível de ser utilizada em reações de deterioração oxidativa, reações enzimáticas e no crescimento de microrganismos. A substituição em 8% da sacarose por sucralose e a utilização do leite semidesnatado na produção dos doces *light* provocou uma diminuição nos teores de sólidos solúveis da mistura, o que influenciou a atividade de água dos doces, que apresentou média de 0,83 para os doces convencionais e de 0,85 para os *light*. De acordo com Franco e Landgraf (1996) e Rocha *et al.* (2017), a maioria das bactérias patogênicas apresentam dificuldades de se desenvolverem em produtos com atividade de água inferiores a 0,90. Considerando a faixa de atividade de água dos doces produzidos e o valor da atividade de água limitante para os fungos deterioradores (0,70), pode-se inferir, segundo Ferramondo *et al.* (1984), que os doces produzidos apresentam características facilitadoras para o desenvolvimento de fungos e leveduras se forem mal estocados em temperaturas elevadas por longos períodos ou mal envasados.

Segundo o descrito na Portaria nº 354, de 04 de setembro de 1997, do MAPA (BRASIL, 1997), o requisito proteína dos doces de leite produzidos estão em consonância aos estabelecidos pela legislação (6 a 9%), os teores de proteínas variaram entre 6,75 – 7,25%. Os doces de leite convencionais com café apresentaram os teores de gordura de 7,55 e 7,69% de acordo com a legislação que estabelece teores entre 6 a 9% de gordura. Já os doces de leite *light* com café, devido à utilização do leite semidesnatado na elaboração dos doces, apresentaram teores menores, 4,83 e 4,76% e, segundo a RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012, pode ser considerado um alimento “reduzido em” ou “*light*” pois apresentou a redução mínima de 25% nos conteúdos de gorduras em relação ao produto convencional (ANVISA, 2012). A redução nos teores de gordura foi em média de 37,00%.

Os teores médios de minerais também ficaram dentro do limite estabelecido pela legislação (menor que 2%). Observa-se na Tabela 6 que as concentrações de minerais foram maiores 1,98% e 1,99% nos doces de leite contendo as microesferas de alginato de cálcio, e isso se deve provavelmente pela presença dos íons cálcio utilizados na microencapsulação. Com relação à substituição do açúcar pelo edulcorante e do leite integral pelo semidesnatado, não foram observadas diferenças significativas. Os teores de minerais nos doces de leite com café, sem a adição de microesferas, foram semelhantes aos relatados por Perrone, Stephani e Neves (2011) e Rocha *et al.* (2017), 1,70% e 1,69%, respectivamente.

Os teores de fibra solúvel foram estatisticamente maiores para os doces de leite *light* com café. A utilização do café solúvel agregou valor nutricional aos doces, aumentando o teor de fibras solúveis.

Os valores calóricos foram maiores ($p < 0,05$) na formulação sem a substituição do açúcar e com o leite integral e os valores calóricos médios para o doce de leite convencional foi de 315,45 Kcal.100 g⁻¹, enquanto para a formulação de doce de leite *light* foi de 297,11 Kcal.100 g⁻¹. Os valores calóricos encontrados para os doces *light* foram semelhantes aos relatados por Guimarães *et al.* (2012). Os doces de leite *light* com café apresentaram menores valores de açúcares totais, em média 43,09% de açúcares, em comparação aos doces de leite convencionais com café em média de 53,40%. Essa diferença resultou na diminuição de 19,30% no teor de açúcares nos doces de leite.

3.5 Caracterização física dos doces

Os parâmetros de cor dos doces de leite produzidos são mostrados na Tabela 4. As formulações de doce de leite *light* com café apresentaram um valor de luminosidade L* (32,34 – 32,82) menor quando comparados aos doces de leite convencionais com café (37,31 – 37,65). Os valores de L* menores indicam que os doces de leite *light* com café apresentaram uma coloração mais escura em comparação ao doce de leite convencional. A coloração dos doces de leite com café é proveniente do café solúvel utilizado e da reação de Maillard, sendo assim, a substituição parcial do açúcar, a utilização do leite semidesnatado e o menor rendimento poderiam ter influenciado na concentração do café solúvel utilizado no doce e consequentemente na cor mais escura dos doces de leite *light* com café.

Tabela 4 – Parâmetros de cor L*, a* e b* dos doces de leite produzidos.

Parâmetros	DCPL	DCPM	DLPL	DLPM
L*	37,31 ± 0,01b	37,65 ± 0,01a	32,34 ± 0,08d	32,82 ± 0,10c
a*	10,30 ± 0,10a	9,76 ± 0,01b	9,09 ± 0,27c	9,26 ± 0,10c
b*	25,41 ± 0,10a	25,33 ± 0,05a	18,15 ± 0,34b	18,50 ± 0,10b

DCPL: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* livres; DCPM: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* microencapsulados; DLPL: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* livres e; DLPM: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* microencapsulados. Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$).

Fonte: Da autora (2021).

É possível observar também variações significativas dentro da mesma formulação, todos os doces que receberam as microesferas apresentaram coloração mais clara, isso se deve à cor das microesferas que elevaram o parâmetro L* das amostras avaliadas. O parâmetro b* varia de amarelo (+) a azul (-). Os valores obtidos para os parâmetros b* (25,41 – 18,15) e parâmetro a* (9,09 – 10,30) mostram que o doce de leite com café é um produto com tendência para o amarelo e vermelho, com predomínio do amarelo, devido aos maiores valores de b*. É possível observar também variações significativas dentro da mesma formulação, todos os doces que receberam as microesferas apresentaram coloração mais clara.

Os resultados encontrados para o parâmetro L* -30,16, a* -10,38 e b* -13,22, por Rocha *et al.* (2017) foram diferentes aos encontrados neste trabalho. Rocha *et al.* (2017) substituíram o leite

por soro de leite nas formulações dos doces de leite com café, o que poderia justificar uma menor luminosidade. Ranalli, Andrés e Califano, (2012), analisando doces de leite com valor calórico reduzido, encontraram valores diferentes aos relatados de L* 50,40 - 37,9, a* 8,15 - 9,07 e b* de 26,10 - 20,10. Gaze *et al.* (2015) avaliaram marcas comerciais brasileiras e encontraram valores médios para L* 48,59 – 62,11, a* 13,60 – 16,90 e para o b* 17,89 – 27,70. De acordo com Rocha *et al.* (2017), a cor do doce de leite representa um padrão regional e mesmo no doce de leite tradicional haverá diferença marcante na cor.

Na Tabela 5 estão apresentados os parâmetros avaliados de textura para as amostras de doce de leite convencional e doce de leite *light* com café adicionados de *L. paracasei* livres e microencapsulados.

Tabela 5 – Dureza, adesividade, elasticidade, coesividade e gomosidade dos doces de leite produzidos.

Parâmetro	DCPL	DCPM	DLPL	DLPM
Dureza (g)	121,76 ± 8,82a	120,12 ± 18,28a	78,90 ± 1,30b	75,71 ± 11,13b
Adesividade (g.s ⁻¹)	-374,5 ± 22,58b	-392,73 ± 29,68b	-236,30 ± 5,57a	-262,83 ± 29,75a
Elasticidade	0,84 ± 0,04a	0,81 ± 0,11a	0,83 ± 0,01a	0,80 ± 0,02a
Coesividade	0,81 ± 0,01a	0,78 ± 0,04a	0,78 ± 0,07a	0,75 ± 0,02a
Gomosidade	98,46 ± 8,25a	93,64 ± 14,55a	61,85 ± 4,86b	56,04 ± 6,80b

DCPL: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* livres; DCPM: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* microencapsulados; DLPL: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* livres e; DLPM: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* microencapsulados. Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$).

Fonte: Da autora (2021).

A adição das microesferas nos doces de leite *light* e no doce de leite convencional com café não influenciou significativamente na textura dos doces. Os doces de leite convencionais apresentaram maiores valores ($p < 0,05$) de dureza e de gomosidade em comparação aos doces de leite *light* com café. Pode-se inferir que maiores valores de umidade e de atividade de água nas amostras *light* influenciaram na dureza dos doces e consequentemente na gomosidade, que é o produto da dureza pela coesividade. Os doces de leite *light* com café apresentaram maior adesividade em relação aos doces convencionais, mostrando requerer um trabalho maior para

superar as forças atrativas entre a superfície do alimento e outras superfícies em que o alimento entra em contato ou, ainda, maior força requerida para remover o alimento que aderiu ao céu da boca, geralmente o palato, mas também lábios e dentes durante a mastigação (FOX *et al.*, 2000).

Pode-se observar na Tabela 5 que as amostras de doce de leite convencionais com café apresentaram valores médios de dureza de 120,94, adesividade de -383,61, elasticidade de 0,82, coesividade de 0,79 e de gomosidade 96,05, próximos aos relatados por Rocha *et al.* (2017) para doces de leite convencionais com café, de 130,8 para dureza, -366,7 para adesividade, 0,93 para elasticidade, 0,64 para coesividade e 82,30 para gomosidade.

3.6 Alterações durante o armazenamento

3.6.1 Atividade de água

Durante o armazenamento por 90 dias a 4 °C não foram observadas diferenças significativas na atividade de água dos doces de leite. O doce de leite convencional com probióticos livres manteve a atividade de água na faixa de 0,8391 e o doce de leite convencional com probióticos microencapsulados em 0,8406. Também não foram observadas diferenças significativas na atividade de água dos doces de leite *light* com probióticos livres que se mantiveram na faixa de 0,8515 e nem para os doces de leite *light* com probióticos microencapsulados em 0,8523.

Os resultados corroboram com Aragon-Alegro *et al.* (2007), que não observaram durante o armazenamento de *mousse* de chocolate adicionado de *L. paracasei* diferenças significativas na atividade de água, e com Rocha *et al.* (2007).

3.6.2 Acidez titulável

Na Tabela 6 estão apresentados os teores de acidez dos doces de leite com café durante o armazenamento por 90 dias a 4 °C. Após 90 dias a acidez dos doces de leite convencional e *light* contendo probióticos microencapsulados ficaram em 0,37%, enquanto nos doces de leite convencionais contendo os probióticos livres ficaram em 0,38% e no doce de leite *light* em 0,39%.

A acidez do doce de leite manteve-se em níveis aceitáveis. Apresentou pequenas variações de no máximo 0,11% em relação à acidez inicial. Rocha *et al.* (2017) observaram mudanças no

teor de acidez dos doces de leite com substituição parcial do leite por soro com café durante o armazenamento. Inicialmente a acidez do doce de leite com café era de 0,45% e durante o armazenamento por 120 dias caiu para 0,34%.

Tabela 6 – Teores de acidez titulável (%) em formulações de doce de leite com café produzidas durante o período de armazenamento a 4 °C.

Acidez titulável (%)	DCPL	DCPM	DLPL	DLPM
0	0,27 ± 0,02Fb	0,27 ± 0,00Eb	0,29 ± 0,00Ea	0,29 ± 0,01Ea
15	0,29 ± 0,01Eb	0,29 ± 0,00Db	0,31 ± 0,00Da	0,31 ± 0,00Da
30	0,29 ± 0,00Eb	0,30 ± 0,01Cb	0,31 ± 0,00Da	0,31 ± 0,00Da
45	0,30 ± 0,00Db	0,30 ± 0,00Cb	0,34 ± 0,01Ca	0,34 ± 0,00Ca
60	0,32 ± 0,01Cd	0,33 ± 0,00Bc	0,34 ± 0,01Cb	0,36 ± 0,00Ba
75	0,34 ± 0,02Bb	0,34 ± 0,00Bb	0,37 ± 0,00Ba	0,36 ± 0,00Ba
90	0,38 ± 0,00Aa	0,37 ± 0,01Ac	0,39 ± 0,00Ab	0,37 ± 0,01Ac

DCPL: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* livres; DCPM: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* microencapsulados; DLPL: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* livres e; DLPM: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* microencapsulados. Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$).

Fonte: Da autora (2021).

3.6.3 Avaliação microbiológica

Durante o armazenamento dos doces de leite *light* e convencional adicionados de probióticos livres ou microencapsulados foram realizadas as análises microbiológicas preconizadas pela Portaria nº 354, de 04 de setembro de 1997 (BRASIL, 1997), e pela RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (ANVISA, 2001), e suas respectivas contagens estão representadas nas Tabelas 7 e 8. Na Tabela 6, a contagem de coliformes totais e *Salmonella* sp. em todas as formulações dos doces de leite, realizada quinzenalmente por um período de 90 dias, atendeu aos requisitos da legislação.

Tabela 7 - Padrão microbiológico para coliformes totais e *Salmonella* sp. dos doces de leite convencional e *light* com probióticos livres e microencapsulados durante o tempo de armazenamento 90 dias a 4 °C.

Tempo (dias)	Coliformes Totais (NMP/g)				<i>Salmonella</i> sp. (UFC/g)			
	DCPL	DCPM	DLPL	DLPM	DCPL	DCPM	DLPL	DLPM
0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.
15	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.
30	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.
45	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.
60	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.
75	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.
90	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.
Máximo permitido	5x10 ¹				Ausente			

DCPL: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* livres; DCPM: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* microencapsulados; DLPL: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* livres e; DLPM: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* microencapsulados. Aus.: Ausente. NMP/g: Número Mais Provável por grama e; UFC/g: Unidades Formadoras de Colônias por grama.

Fonte: Da autora (2021).

Na Tabela 8 estão apresentadas as contagens de *Staphylococcus coagulase* positiva e fungos e leveduras nos doces de leite convencional e *light* adicionados de probióticos livres ou microencapsulados. As contagens realizadas quinzenalmente nos doces de leite por um período de 90 dias atenderam às exigências da legislação.

Tabela 8 - Padrão microbiológico para *Staphylococcus coagulase* positiva e fungos e leveduras dos doces de leite convencional e *light* com probióticos livres e microencapsulados durante o tempo de armazenamento 90 dias a 4 °C.

Tempo (dias)	<i>Staphylococcus coagulase</i> positiva (UFC/g)				Fungos e leveduras (UFC/g)			
	DCPL	DCPM	DLPL	DLPM	DCPL	DCPM	DLPL	DLPM
0	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹
15	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹
10	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹
45	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹
60	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹
75	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹
90	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹	< 1x10 ¹
Máximo permitido	1x10 ²				1x10 ²			

DCPL: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* livres; DCPM: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* microencapsulados; DLPL: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* livres e; DLPM: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* microencapsulados. UFC/g: Unidades Formadoras de Colônias por grama.

Fonte: Da autora (2021).

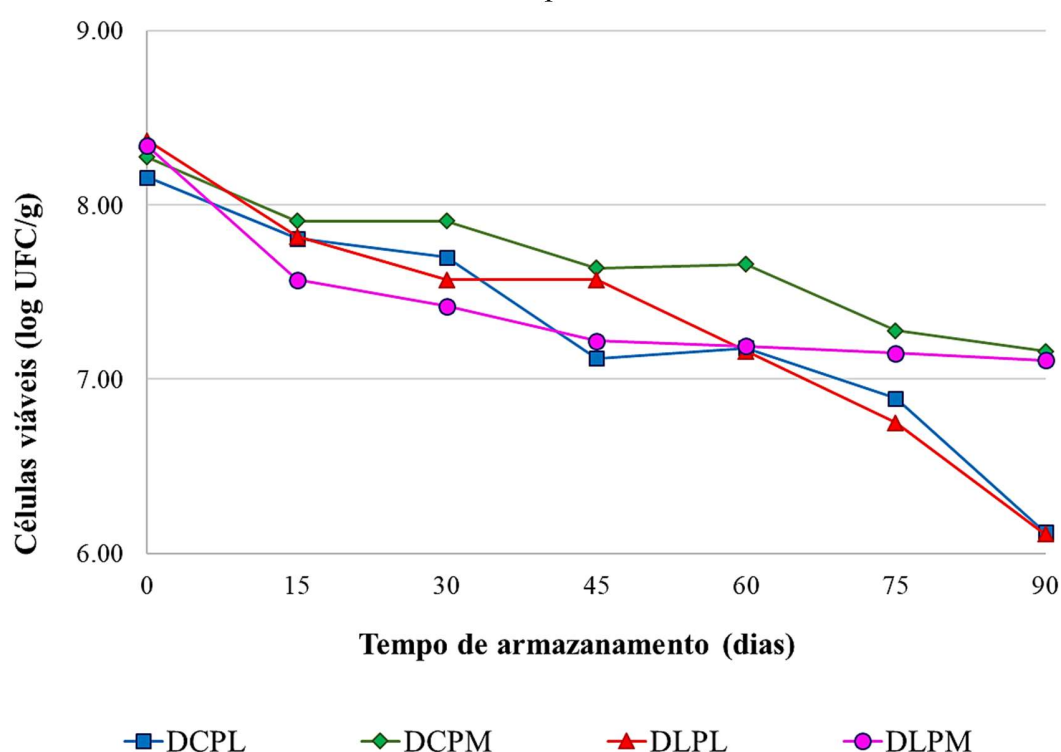
Apesar da baixa temperatura de envase (50 °C) para a adição dos probióticos livres e microencapsulados, a esterilização dos potes foi suficiente para evitar a contaminação dos doces. Martinez *et al.* (1990) recomendam, para condições industriais de fabricação de doce de leite, a temperatura mínima de envase de 50 °C, pois abaixo desta temperatura, problemas microbiológicos são inevitáveis e a viscosidade torna-se elevada, dificultando o processo. Os resultados obtidos foram aos iguais aos relatados por Rocha *et al.* (2017), que mostram que os doces de leite com café estavam dentro do padrão exigido pela legislação.

Hentges *et al.* (2010) mostraram a sobrevivência de bactérias patogênicas no doce de leite por até 30 dias, tornando esse produto um potencial portador de *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O processamento do doce de leite resulta em um produto com vida útil longa devido a sua baixa atividade de água. Boas práticas de fabricação ajudam a tornar o produto mais seguro, mas o fracionamento e a produção artesanal sem as devidas condições de higiene podem causar contaminação (HENTGES *et al.*, 2010).

3.7 Viabilidade das células livres e microencapsuladas de *L. paracasei* nos doces de leite durante o armazenamento

Na Figura 2 estão representadas as contagens de *L. paracasei* em unidades formadoras de colônias por grama de doce de leite, nos respectivos dias de armazenamento.

Figura 2 - Contagem (log UFC/g) de *L. paracasei* livre e microencapsulados em doces de leite *light* e convencional com café durante o período de 90 dias.



DCPL: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* livre; DCPM: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* microencapsulado; DLPL: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* livre e; DLPM: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* microencapsulado.

Fonte: Da autora (2021).

Observa-se que na Figura 2, no tempo de vida útil 0, a ingestão de uma porção diária do doce de leite (uma colher – 20 g) com células livres ou microencapsuladas é capaz de fornecer em média $3,8 \times 10^9$ UFC/porção de probióticos. A legislação brasileira recomenda uma dose mínima de probióticos entre 10^8 e 10^9 UFC/porção diária do produto, para obter os efeitos benéficos à saúde (ANVISA, 2008). Duas colheres de 20 gramas de doce de leite iriam fornecer $7,7 \times 10^9$ UFC/40 g,

quantidade semelhante às relatadas por Mizock (2015) para Yakult (Yakult USA, Inc.), 8 bilhões de bactérias ativas (*L. casei*) por frasco com 80 mL.

Ao término do tempo de vida útil do doce de leite com café com probióticos microencapsulados, uma colher (20 g) forneceria $2,7 \times 10^8$ UFC/porção de *L. paracasei* viáveis, quantidade estabelecida por porção diária segundo a ANVISA. A grande vantagem de se consumir o doce de leite com probióticos microencapsulados é o tempo de vida útil do produto, 90 dias em temperatura de refrigeração, em comparação aos leites fermentados (30 – 40 dias).

A viabilidade inicial de *L. paracasei* foi maior nos doces de leite *light* contendo probióticos microencapsulados ou não. Isso se deve ao fato do rendimento dos doces de leite *light* serem menores com relação aos doces de leite convencional, concentrando os probióticos que foram adicionados em quantidades iguais. A viabilidade de *L. paracasei* no doce de leite convencional adicionado de células livres diminuiu 2,04 ciclos logarítmicos durante o período de armazenamento. Já o doce de leite convencional adicionado de microesferas probióticas apresentou 1,11 ciclos logarítmicos de diminuição. Nos doces de leite *light* com café foi observado o mesmo comportamento, diminuição de 2,26 ciclos logarítmicos nos doces adicionados de células livres e de 1,23 ciclos logarítmicos nos doces com *L. paracasei* microencapsulados.

Ao término do tempo de vida útil do produto, os doces com probióticos microencapsulados (convencional – 7,16 log UFC/g e *light* – 7,11 log UFC/g) apresentaram as maiores contagens e mantiveram a viabilidade na quantidade preconizada de 10^7 unidades formadoras de colônia por grama de produto final (UFC/g).

A microencapsulação manteve a viabilidade das cepas de *L. paracasei* microencapsuladas em 85,90% em média e evitou perdas médias de 0,98 ciclo logarítmico durante os 90 dias de armazenamento a 4 °C. Não foram observadas diferenças significativas entre os doces de leite *light* e os doces de leite convencional com café contendo microesferas de *L. paracasei*, dessa forma podendo-se inferir que a composição química dos doces *light* e convencional não interferiram na viabilidade da cepa.

Os resultados apresentados corroboram com Brinques e Ayub (2011), que observaram perda de viabilidade de 0,55 ciclos logarítmicos de *L. plantarum* imobilizados em alginato a 3% revestido com quitosana, durante 38 dias de armazenamento, e com Ribeiro *et al.* (2014) que em iogurtes contendo *L. acidophilus* LA-5 microencapsulados atenderam aos padrões estabelecidos

pela legislação para probióticos no final da vida útil, com contagens de $3,16 \times 10^9$ e $2,24 \times 10^9$ UFC na porção de 200 gramas, respectivamente.

Vinderola *et al.* (2000) avaliaram o queijo Fresco Argentino como transportador alimentar para culturas probióticas de *bifidobactérias*, *L. acidophilus* e *L. casei*, e as cepas sobreviveram satisfatoriamente até 60 dias. O queijo Minas também foi testado como veículo para *L. paracasei* e para *L. acidophilus* (BURITI *et al.*, 2005; BURITI; ROCHA; SAAD, 2005) e a viabilidade foi mantida até 60 dias.

3.8 Viabilidade das cepas livres e microencapsuladas nos doces de leite em condições gastrointestinais simuladas

Na Tabela 9, após 30 dias de armazenamento, estão representadas as viabilidades das cepas livres e microencapsuladas de *L. paracasei* adicionadas aos doces de leite convencional ou *light* com café durante as condições gastrointestinais simuladas.

Tabela 9 – Viabilidade (log UFC/g) das cepas livres ou microencapsuladas de *L. paracasei* adicionadas aos doces de leite convencional ou *light* com café às condições gastrointestinais, após 30 dias de armazenamento a 4 °C.

Tempo de digestão (minutos)	Formulações de doces de leite com café			
	DCPL (log UFC/g)	DCPM (log UFC/g)	DLPL (log UFC/g)	DLPM (log UFC/g)
0	7,68 ± 0,21Aa	7,81 ± 0,01Aa	7,46 ± 0,00Ab	7,51 ± 0,07Ab
120	7,14 ± 0,00Bb	7,47 ± 0,15Ba	7,11 ± 0,05Bc	7,20 ± 0,08Bb
240	6,99 ± 0,01Cc	7,29 ± 0,15Ca	6,99 ± 0,01Cc	7,10 ± 0,08Bb

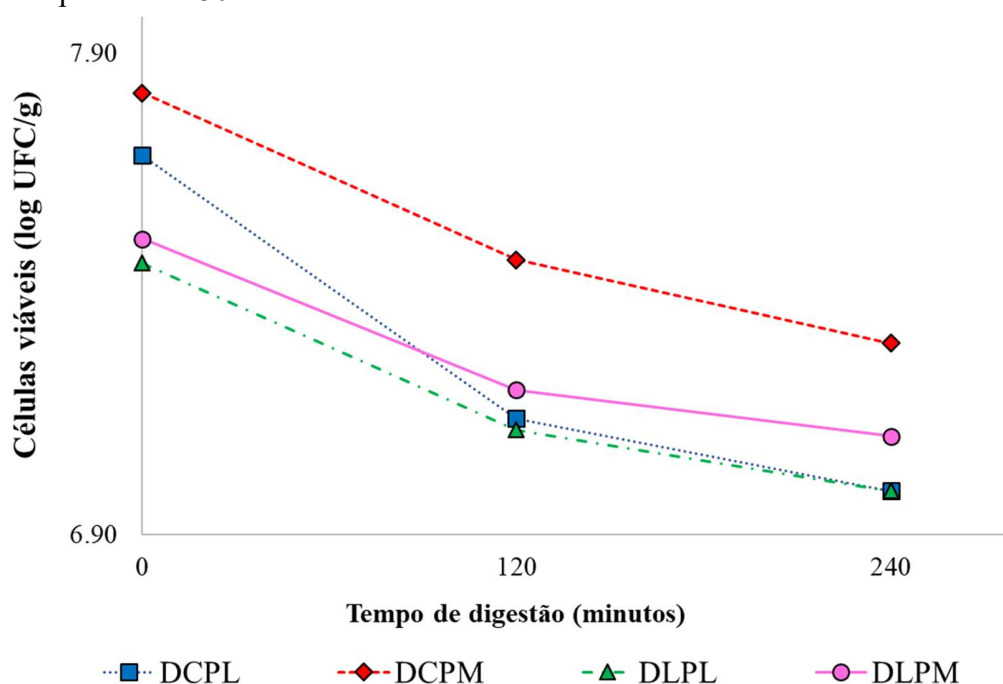
DCPL: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* livres; DCPM: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* microencapsulados; DLPL: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* livres e; DLPM: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* microencapsulados. Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$).

Fonte: Da autora (2021).

Na Figura 3 é possível observar que as viabilidades das cepas livres diminuíram em média 0,58 log UFC/g quando presentes nos doces convencionais e nos doces de leite *light* com café. Quando microencapsuladas, essas cepas se mostraram mais resistentes às condições

gastrointestinais e apresentaram diminuições médias de 0,46 log UFC/g. Em 120 minutos de digestão, em condições gástricas, as cepas de *L. paracasei* livres nos doces de leite *light* ou convencional diminuíram mais, em média 0,44 log UFC/g, em relação às condições entéricas, em média 0,135 log UFC/g. O mesmo comportamento foi observado para as cepas microencapsuladas, em ambiente ácido 0,32 log UFC/g e em ambiente intestinal 0,14 log UFC/g. O doce de leite como matriz para transportar cepas probióticas melhorou sua sobrevivência durante a passagem gastrointestinal. Isso é devido ao efeito tampão do alimento no estômago, aumentando o pH para aproximadamente 4,5 (TULUMOGLU *et al.*, 2014).

Figura 3 – Contagem (log UFC/g) de *L. paracasei* livres e microencapsulados em doces de leite *light* e convencional com café submetidos às condições gástricas simuladas, após o período de 30 dias de armazenamento.



DCPL: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* livres; DCPM: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* microencapsulados; DLPL: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* livres e; DLPM: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* microencapsulados.

Fonte: Da autora (2021).

Estes resultados corroboram com Li *et al.* (2018), que avaliaram a sobrevivência de *Lactobacillus rhamnosus* microencapsulados em uma matriz de alginato, com microesferas de tamanho semelhante às encontradas neste trabalho, sob suco gástrico simulado (pH 2,5 e 3,6), suco

intestinal (0,3% e 2% de sal biliar) e armazenamento a 4 ° C e concluíram que as cepas diminuíram mais em condições gástricas do que em condições intestinais. Os mesmos autores concluíram que proteção das cepas microencapsuladas foram significativamente maiores do que as de células livres.

Na Tabela 10 e Figura 4 estão representadas as viabilidades das cepas após 60 dias de armazenamento em 4 ° C. As células livres de *L. paracasei* em doces de leite convencional e *light* sob condições gastrointestinais diminuíram em média 0,51 log UFC/g e as microencapsuladas em média 0,41 log UFC/g. Todos os outros estudos (ALBERTINI *et al.*, 2011; COOK *et al.*, 2011; GHARSALLAOUI *et al.*, 2007, SABIKHI *et al.*, 2010) relataram sobrevivência melhorada de *Lactobacillos* e *Bifidobactérias* em um ambiente gastrointestinal como um resultado do encapsulamento de alginato.

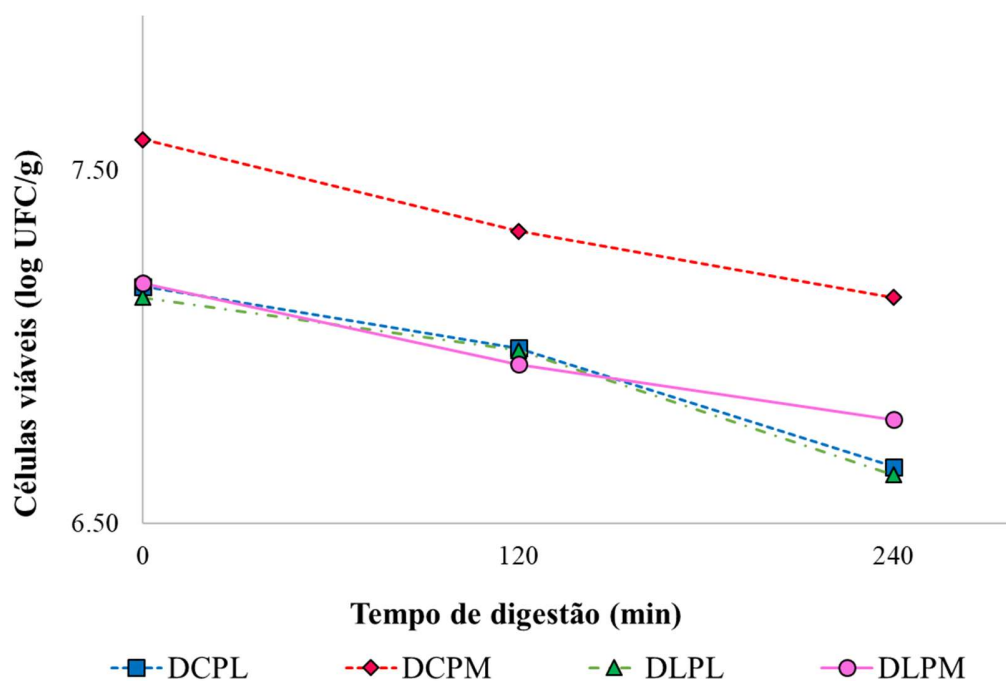
Tabela 10 – Viabilidade (log UFC/g) das cepas livres ou microencapsuladas de *L. paracasei* adicionadas aos doces de leite convencional ou *light* com café às condições gastrointestinais, após 60 dias de armazenamento a 4 ° C.

Tempo de digestão (minutos)	Formulações de doces de leite com café			
	DCPL (log UFC/g)	DCPM (log UFC/g)	DLPL (log UFC/g)	DLPM (log UFC/g)
0	7,17 ± 0,00Ab	7,58 ± 0,11Aa	7,14 ± 0,00Ab	7,18 ± 0,07Ab
120	6,99 ± 0,01Bb	7,32 ± 0,02Ba	6,99 ± 0,06Bb	6,95 ± 0,00Bb
240	6,66 ± 0,01Cb	7,14 ± 0,07Ca	6,63 ± 0,14Cb	6,79 ± 0,04Cb

DCPL: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* livres; DCPM: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* microencapsulados; DLPL: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* livres e; DLPM: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* microencapsulados. Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$).

Fonte: Da autora (2021).

Figura 4 - Contagem (log UFC/g) de *L. paracasei* livre e microencapsulados em doces de leite *light* e convencional com café submetidos às condições gástricas simuladas, após o período de 60 de dias de armazenamento.



DCPL: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* livres; DCPM: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* microencapsulados; DLPL: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* livres e; DLPM: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* microencapsulados.

Fonte: Da autora (2021).

Após 90 dias de armazenamento a 4 °C observa-se na Tabela 11 que os doces de leite convencional ou *light* com café adicionados com células microencapsuladas de *L. paracasei* apresentaram as viabilidades desejáveis de 6,41 e de 6,60 log UFC/g, respectivamente.

As contagens médias de 6,50 log UFC/g em condições gastrointestinais simuladas são o suficiente para a alegação de produto funcional. O consumo de uma colher (20 g/porção diária) do doce de leite com probióticos microencapsulados forneceriam $6,3 \times 10^7$ UFC/20 g de *L. paracasei*, após passagem pelas condições adversas do trato gastrointestinal simulado.

Tabela 11 – Viabilidade (log UFC/g) das cepas livres ou microencapsuladas de *L. paracasei* adicionadas aos doces de leite convencional ou *light* com café às condições gastrointestinais, após 90 dias de armazenamento a 4 °C.

Tempo de digestão (minutos)	Formulações de doces de leite com café			
	DCPL (log UFC/g)	DCPM (log UFC/g)	DLPL (log UFC/g)	DLPM (log UFC/g)
0	6,12 ± 0,08Ab	7,14 ± 0,07Aa	6,10 ± 0,01Ab	7,11 ± 0,07Aa
120	5,96 ± 0,10Bb	6,89 ± 0,09Ba	6,04 ± 0,04Bb	6,88 ± 0,01Ba
240	5,38 ± 0,00Cb	6,41 ± 0,00Ca	5,25 ± 0,00Cb	6,60 ± 0,00Ca

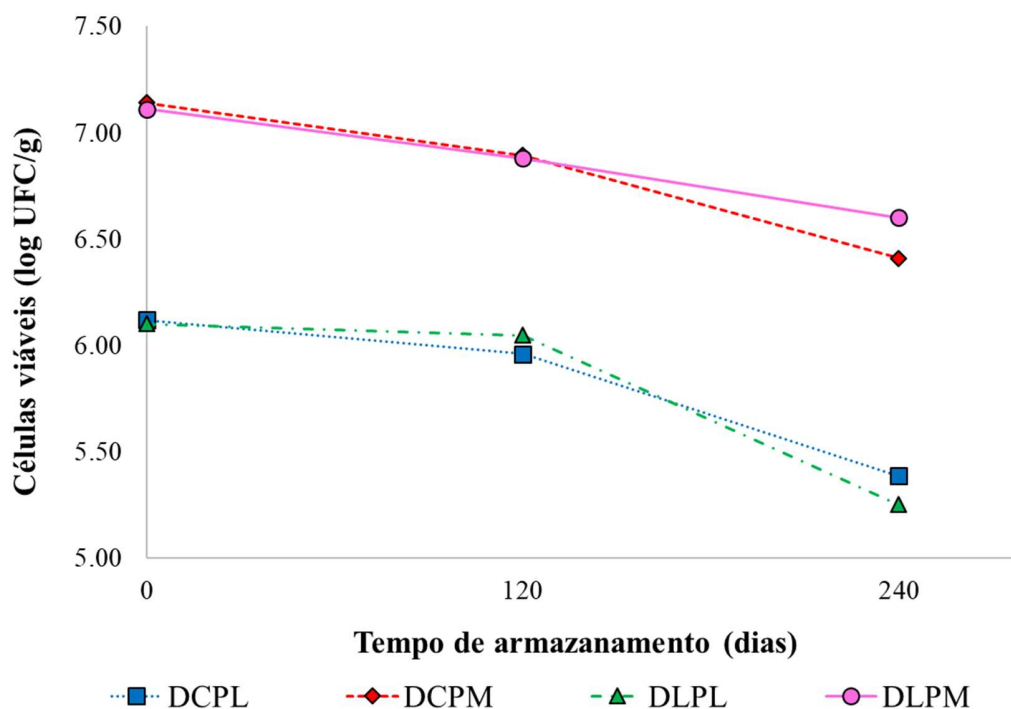
DCPL: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* livres; DCPM: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* microencapsulados; DLPL: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* livres e; DLPM: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* microencapsulados. Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$).

Fonte: Da autora (2021).

Na Figura 5 os doces de leite convencional e *light* com café contendo o probiótico livre, em 90 dias de armazenamento, as contagens nas simulações gastrointestinais foram de 5,38 UFC/g e de 5,25 log UFC/g, respectivamente. Essas quantidades não seriam suficientes para a alegação de alimento funcional. Sendo assim, o tempo de vida útil do doce de leite convencional ou *light* com *L. paracasei* livres deveria ser de 60 dias, momento em que as contagens em condições gastrointestinais estariam em 6,66 e 6,63 log UFC/g, respectivamente.

As diminuições na viabilidade *L. paracasei* livres foram em média de 0,79 log UFC/g e nos doces convencional e *light* com células microencapsuladas de 0,62 log UFC/g.

Figura 5 - Contagem (log UFC/g) de *L. paracasei* livres e microencapsulados em doces de leite *light* e convencional com café submetidos às condições gástricas simuladas, após o período de 90 de dias de armazenamento.



DCPL: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* livres; DCPM: Doce de leite com café convencional adicionado de *L. paracasei* microencapsulados; DLPL: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* livres e; DLPM: Doce de leite com café *light* adicionado de *L. paracasei* microencapsulados.

Fonte: Da autora (2021).

Pode-se inferir que as formulações *light* e convencional contendo as microesferas apresentam-se como melhor veículo para *L. paracasei*. A formulação *light* apresenta uma melhor opção para quem busca saudabilidade, pois contém menores teores de gorduras, açúcares e maiores teores de fibras dietéticas solúveis provenientes do café.

4 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a microencapsulação através da técnica de gelificação iônica externa com atomização por ar pressurizado foi eficiente para conferir proteção e manter a viabilidade de *L. paracasei* em doces de leite convencional e *light* com café. Foi possível elaborar doces de leite *light* com café para a entrega de células microencapsuladas de *L. paracasei* com

redução de 19,30% no teor de açúcares e de 37,13% no teor de gordura. Durante o armazenamento por 90 dias a 4 °C, o padrão microbiológico para coliformes totais, *Salmonella* sp, *Staphylococcus coagulase* positiva e fungos e leveduras dos doces de leite atenderam aos requisitos da legislação, não foram observadas diferenças significativas na atividade de água e a acidez se manteve em níveis aceitáveis, apresentando pequenas variações de no máximo 0,11% em relação à acidez inicial. A adição das microesferas nos doces de leite não influenciou significativamente na textura dos doces. Todos os doces que receberam as microesferas apresentaram coloração mais clara e o parâmetro L* das amostras avaliadas foram elevados.

As contagens de *L. paracasei* inicial nos doces de leite com café foram em média de 8,28 log UFC/g e uma porção (20 g) forneceria $3,8 \times 10^9$ UFC de *L. paracasei*. Ao término do tempo de vida útil do produto, 90 dias de armazenamento a 4 °C, os doces de leite com café convencional ou *light* com células microencapsuladas forneceria em média $2,7 \times 10^8$ UFC/porção de *L. paracasei* e a viabilidade foi mantida na quantidade preconizada de $10^9 - 10^8$ UFC/porção.

As células adicionadas aos doces de leite foram testadas em condições gástricas e ao término do armazenamento, células aprisionadas tiveram suas viabilidades mantidas em 6,50 log UFC/g. A recomendação diária para o consumo de doce de leite com café adicionado de *L. paracasei* microencapsulados é de uma porção de 20 gramas, que forneceria $6,3 \times 10^7$ UFC de *L. paracasei*, após passagem pelas condições adversas do trato gastrointestinal simulado.

Foi possível desenvolver uma sobremesa com grande potencial de mercado, alegação de produto funcional e com redução de gorduras e açúcares e vida de prateleira de 90 dias.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências brasileiras de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, S. A. *et al.* Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, [Lavras], v. 34, n. 2, p. 414–420, mar. 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cagro/a/tpKp6ZMmwYKjf9cZDzmg8zx/?format=pdf>. Acesso em: 01 jan. 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n.º 241, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 27 jul. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n.º 54, de 12 de novembro de 2012. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre informação nutricional complementar. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 12 nov. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n.º 331, de 23 de dezembro de 2019. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 26 dez. 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n.º 277, de 22 de setembro de 2005. Dispõe sobre o regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 22 dez. 2000.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n.º 241, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 27 jul. 2018.

ALBERTINI, B. *et al.* Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [Amsterdam], v. 40, n. 4, p. 359–366, July 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0928098710001569>. Acesso em: 05 jan. 2021.

ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**, [London], v. 18, n. 5, p. 240-251, May. 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224407000350>. Acesso em: 01 set. 2021.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC International**. 17. ed. Maryland: AOAC International, 2007.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC International**. Official Method 991.41: Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fibre in Foods. In: Cereal Foods. Gaithersburg: AOAC Internacional, 1995. p. 7-9.

ARAGON-ALEGRO, L. C. *et al.* Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT - Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 40, n. 4, p. 669–675, May. 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S002364380600051X>. Acesso em: 25 jan. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria n.º 354, de 4 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Doce de Leite. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil: Poder Executivo**, Brasília, DF, 04 set. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 62 de 26 de agosto de 2003, que estabelece os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil: Poder Executivo**, Brasília, DF, 26 ago. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa n.º 53, de 1º de outubro de 2018. Aprova o Regulamento técnico mercosul de identidade e qualidade do leite em pó. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil: Poder Executivo**, Brasília, DF, 16 out. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n.º 68, de 12 de dezembro de 2006. Dispõe dos métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil: Poder Executivo**, Brasília, DF, 14, dez. 2006.

BRAVO, J. *et al.* Evaluation of spent coffee obtained from the most common coffeemakers as a source of hydrophilic bioactive compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [Washington], v. 60, n. 51, p. 12565–12573, Dec. 2012. Disponível em: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/315553>. Acesso em: 03 jan. 2021.

BRINQUES, G. B.; AYUB, M. A. Z. Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. **Journal of Food Engineering**, [Oxford], v. 103, n. 2, p. 123–128, Mar. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877410004942>. Acesso em: 12 fev. 2021.

BUDRYN, G.; NEBESNY, E. Effect of green and roasted coffee antioxidants on quality and shelf life of cookies and chocolates. **Journal of Food Processing and Preservation**, [Boston], v. 37, n. 5, p. 835–845, Apr. 2013. Disponível em: <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4549.2012.00710.x>. Acesso em: 12 jun. 2021.

- BURITI, F. C. A. *et al.* Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **LWT - Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 38, n. 2, p. 173–180, Mar. 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643804001355>. Acesso em: 22 jan. 2021.
- BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S. da; SAAD, S. M. I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, [Wageningen], v. 15, n. 12, p. 1279–1288, Dec. 2005. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/001503085>. Acesso em: 20 fev. 2021.
- CASAGRANDE, R. *et al.* In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, [Amsterdam], v. 328, n. 2, p. 183–190, Aug. 2007. Disponível em: <https://europepmc.org/article/MED/16959452>. Acesso em: 15 jan. 2021.
- CHAMPAGNE, C. P. *et al.* Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 149, n. 3, p. 185–193, Oct. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160511003795>. Acesso em: 02 jan. 2021.
- CHARTERIS, W. P. *et al.* Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **The International Journal of Dairy Technology**, [Long Hanborough], v. 51, n. 4, p. 123–136, Nov. 1998. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-0307.1998.tb02516.x>. Acesso em: 10 ago. 2021.
- CHÁVARRI, M. *et al.* Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 142, n. 1-2, p. 185–189, Aug. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20659775/>. Acesso em: 20 jan. 2021.
- COOK, M. T. *et al.* Production and evaluation of dry alginate–chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. **Biomacromolecules**, [Washington], v. 12, n. 7, p. 2834–2840, May 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21574635/>. Acesso em: 11 fev. 2021.
- DE ANDRADE, D. P. *et al.* Stability of microencapsulated lactic acid bacteria under acidic and bile juice conditions. **International Journal of Food Science and Technology**, [Malden], v. 54, n. 7, p. 2355–2362, July 2019. Disponível em: <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ijfs.14114>. Acesso em: 06 jan. 2021.
- DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. **Journal of Applied Bacteriology**, [Hoboken], v. 23, n. 1, p. 130–135, Apr. 1960. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>. Acesso em: 02 fev. 2021.

DE MATOS-JÚNIOR, F. E. *et al.* Evaluation of the viability and the preservation of the functionality of microencapsulated *Lactobacillus paracasei* BGP1 and *Lactobacillus rhamnosus* 64 in lipid particles coated by polymer electrostatic interaction. **Journal of Functional Foods**, [Roma], v. 54, p. 98–108, Mar. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464619300064>. Acesso em: 24 jan. 2021.

DÍAZ-RUBIO, E. M.; SAURA-CALIXTO, F. Dietary fiber in brewed coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [Washington], v. 55, n. 5, p. 1999–2003, Mar. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17295507/>. Acesso em: 12 jan. 2021.

DISCHE, Z. General color reactions. *In*: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. (eds.). **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic Press, 1962. p. 477-512.

FAO/WHO. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, 2001. **Report of a joint FAO/WHO working group**, Córdoba, Argentina, 1-4 October, 2001. p. 1-33. Disponível em: <http://pc.ilele.hk/public/pdf/20190225/bd3689dfc2fd663bb36def1b672ce0a4.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2021.

FERRAMONDO, A. *et al.* Chemical microbiological studies on “Dulce de leche” a typical Argentine confectionery product. **Journal of Food Science**, [Chicago], v. 49, n. 3, p. 821-823, May 1984. Disponível em: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.1984.tb13220.x>. Acesso em: 12 jan. 2021.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, [Lavras], v. 35, n. 6, p. 1039–1042, Dec. 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cagro/a/yjKLJXN9KysfmX6rvL93TSh>. Acesso em: 03 jan. 2021.

FERREIRA, L. de O. *et al.* Adição de soro de leite e café na qualidade do doce de leite pastoso. **Ciência Rural**, [Santa Maria], v. 42, n. 7, p. 1314–1319, jul. 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/5mhGbc6yRXnsxf7tscGBDmK/?lang=pt>. Acesso em: 15 jan. 2021.

FOX, P. F. *et al.* **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

GARCÍA-CEJA, A. *et al.* Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined lactobacilli encapsulated in alginate or alginate-chitosan. **LWT - Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 63, n. 1, p. 482–489, Sept. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643815002248>. Acesso em: 15 jan. 2021.

GAZE, L. V. *et al.* Dulce de Leche, a typical product of Latin America: Characterisation by physicochemical, optical and instrumental methods. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 169, n. 15, p. 471–477, Feb. 2015. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814614012321>. Acesso em: 15 jan. 2021.

GHARSALLAOUI, A. *et al.* Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 40, n. 9, p. 1107–1121, Nov. 2007. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996907001238>. Acesso em: 19 jan. 2021.

GNIECHWITZ, D. *et al.* Dietary fiber from coffee beverage: Degradation by human fecal microbiota. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [Washington], v. 55, n. 17, p. 6989–6996, Aug. 2007. Disponível em:

<https://www.scrip.org/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=883872>. Acesso em: 03 jan. 2021.

GUIMARÃES, I. C. de O. *et al.* Development and description of light functional dulce de leche with coffee. **Ciência e Agrotecnologia**, [Lavras], v. 36, n. 2, p. 195-203, Apr. 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cagro/a/8VB6qxdYczz7TdLZ8phnK4P/?format=pdf&lang=en>.

Acesso em: 01 jun. 2021.

GUL, O. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* Shirota by spray drying using different combinations of wall materials and application for probiotic dairy dessert. **Journal of Food Processing and Preservation**, [Boston], v. 41, n. 5, Oct. 2017. Disponível em:

<https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpp.13198>. Acesso em: 10 fev. 2021.

HENTGES, D. *et al.* Pathogenic microorganism survival in dulce de leche. **Food Control**, [Amsterdam], v. 21, n. 9, p. 1291–1293, Sept. 2010. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713510000770>. Acesso em: 25 jan. 2021.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas, métodos físicos e químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. Disponível em:

<https://wp.ufpel.edu.br/nutricaoobromatologia/files/2013/07/NormasADOLFOLUTZ.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2021.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria.

International Dairy Journal, [Wageningen], v. 14, n. 8, p. 737–743, Aug. 2004. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694604000172>. Acesso em: 14 jan. 2021.

LI, N. *et al.* Structural, rheological and functional properties of modified soluble dietary fiber from tomato peels. **Food Hydrocolloids**, [Oxford], v. 77, p. 557–565, Apr. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X16310153>. Acesso em: 02 jan. 2021.

MARTINEZ, E.; HOUGH, G.; CONTARINI, A. Sandiness prevention in Dulce de Leche by seeding with lactose. **Journal of Dairy Science**, [Champaign], v. 73, n. 3, p. 612-616, Mar. 1990. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030290787103>. Acesso em: 22 jan.2021.

MARTINS, J. F. P.; LOPES, C. N. Doce de leite: aspectos da tecnologia de fabricação. **Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n. 18, p. 1-37, 1981.

MILAGRES, M. P. *et al.* Análise físico-química e sensorial de doce de leite produzido sem adição de sacarose. **Revista Ceres**, [Viçosa], v. 57, n. 4, p. 439–445, jul./ago. 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/262634285_Physicochemical_and_sensorial_analyses_of_milk_fudge_prepared_without_sugar. Acesso em: 07 set. 2021.

MIZOCK, B. A. Probiotics. **Disease-a-Month**, [Chicago], v. 61, n. 7, p. 259–290, Apr. 2015. Disponível em: <https://europepmc.org/article/MED/25921792>. Acesso em: 12 nov. 2021.

NAIDU, M. M. *et al.* Studies on the extraction and antioxidant potential of green coffee. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 107, n. 1, p. 377–384, Mar. 2008. Disponível em: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/714888>. Acesso em: 10 jan. 2021.

OTÁLORA, M. C. *et al.* Encapsulating betalains from *Opuntia ficus-indica* fruits by ionic gelation: Pigment chemical stability during storage of beads. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 202, p. 373–382, July 2016. Disponível em: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/5260426>. Acesso em: 17 jan. 2021.

PERRONE, Í. T. **Efeito da nucleação secundária sobre a cristalização do doce de leite**. 2006. 59 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

PERRONE, Í. T.; STEPHANI, R.; NEVES, B. S. **Doce de leite: aspectos tecnológicos**. Juiz de Fora, 2011. p. 286.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [Washington], v. 53, n. 10, p. 4290–4302, May 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15884874/>. Acesso em: 12 jan. 2021.

RANALLI, N.; ANDRÉS, S. C.; CALIFANO, A. N. Physicochemical and rheological characterization of “dulce de leche”. **Journal of Texture Studies**, [Hoboken], v. 43, n. 2, p. 115-123, Apr. 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1745-4603.2011.00321.x>. Acesso em: 12 jun. 2021.

- RIBEIRO, M. C. E. *et al.* Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 66, p. 424–431, Dec. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996914006656>. Acesso em: 02 jan. 2021.
- ROCHA, L. de O. F. *et al.* Storage time effect on ‘Dulce de leche’ characteristics with coffee and whey. **Acta Scientiarum. Technology**, [Maringá], v. 39, n. 4, p. 503-510, Oct./Dec. 2017. Disponível em: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciTechnol/article/view/29396>. Acesso em: 02 jan. 2021.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [São Paulo], v. 42, n. 1, p. 1-16, jan./mar. 2006. Disponível em: <https://docplayer.com.br/5436857-Probioticos-e-prebioticos-o-estado-da-arte.html>. Acesso em: 18 nov. 2021.
- SABIKHI, L. *et al.* Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. **Food Bioprocess Technology**, [Berlim], v. 3, n. 4, p. 586–593, Aug. 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/226150017_Resistance_of_Microencapsulated_Lactobacillus_acidophilus_LA1_to_Processing_Treatments_and_Simulated_Gut_Conditions. Acesso em: 01 jan. 2021.
- SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. D. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). **Food Chemistry**, [Oxford], v. 90, n. 1–2, p. 133–139, Mar./Apr. 2005. Disponível em: <https://digital.csic.es/handle/10261/121661>. Acesso em: 15 jan. 2021.
- SILVA, A. C. da. **Desenvolvimento de doce de leite sem adição de sacarose e sem lactose**. 2016. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2016.
- SILVA, K. C. G. *et al.* Symbiotic microencapsulation to enhance *Lactobacillus acidophilus* survival. **LWT - Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 89, p. 503–509, Mar. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817308459>. Acesso em: 12 jun. 2021.
- SIMEONI, C. P. **Elaboração de doce de leite light contendo probióticos microencapsulados**. 2015. 125 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, [Davis], v. 16, p. 144-158, Jan. 1965. Disponível em: <https://www.ajevonline.org/content/16/3/144>. Acesso em: 02 jan. 2021.

SOUSA, S. *et al.* Characterization of freezing effect upon stability of, probiotic loaded, calcium-alginate microparticles. **Food and Bioproducts Processing**, [Londres], v. 93, p. 90–97, Jan. 2015. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960308513001259>. Acesso em: 07 set. 2021.

SZCZESNIAK, A. S. Classification of textural characteristics. **Journal of Food Science**, [Chicago], v. 28, n. 4, p. 385–389, July 1963. Disponível em:

<https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.1963.tb00215.x>. Acesso em: 17 jan. 2021.

TEIXEIRA, M. A. **Influência da adição de biopolímeros e de diferentes técnicas de gotejamento na encapsulação de alfa-tocoferol por gelificação iônica**. 2021. 96 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Biomateriais) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2021.

TORRES, E. A. F. S. *et al.* Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal. **Food Science and Technology**, [Campinas], v. 20, n. 2, p.145-150, ago. 2000.

Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/Vh7hsZFBHqNnFkgwTvjtvbv/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 15 jan. 2021.

TULUMOĞLU, S.; KAYA, H. I.; ŞİMŞEK, Ö. Probiotic characteristics of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from Tulum cheese. **Anaerobe**, [Amsterdam], v. 30, p. 120–125, Dec. 2014. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1075996414001371>. Acesso em: 22 jan. 2021.

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material.

Food Chemistry, [Oxford], v. 124, n. 3, p. 863–868, Feb. 2011. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814610008319>. Acesso em: 10 jan. 2021.

VINDEROLA, C. G. *et al.* Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. **Journal of Dairy Science**, [Champaign], v. 83, n. 9, p. 1905–1911, Sept. 2000. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203020075065X>. Acesso em: 10 jan. 2021.

WANG, J. *et al.* Fermentation characteristics and transit tolerance of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang in soymilk and bovine milk during storage. **Journal of Dairy Science**, [Champaign], v. 92, n. 6, p. 2468–2476, June 2009. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19447978/>. Acesso em: 22 jan. 2021.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 1 – Composição físico-química do leite em pó integral e do leite semidesnatado, utilizados nas formulações dos doces de leite.

Requisitos	Leite em pó integral	Instrução Normativa n° 53 (BRASIL, 2018)
Gordura (%)	27,36	Maior ou igual a 26,0
Umidade (%)	3,24	Máximo 5,0
Proteínas no ESD (%)	37,08	Mínimo 34
Acidez (ml NaOH 0,1N/10 g sólidos não gordurosos)	16,56	Máximo 18,0
	Leite em pó semidesnatado	Instrução Normativa n° 53 (BRASIL, 2018)
Gordura (%)	13,01	Maior a 1,5 e menor a 26,0
Umidade (%)	3,69	Máximo 5,0
Proteínas no ESD (%)	38,02	Mínimo 34
Acidez (ml NaOH 0,1N/10 g sólidos não gordurosos)	16,12	Máximo 18,0

Fonte: Da autora (2021).

Tabela 2 – Composição físico-química do café solúvel utilizado na formulação dos doces de leite.

Composição físico-química	(%)	RDC N° 277 (ANVISA, 2005)
pH	5,4 ± 0,01	5,0 ± 0,5
Umidade	2,01 ± 0,05	Máximo de 5%
Proteína	12,76 ± 0,24	-
Resíduo mineral fixo	7,36 ± 0,17	Máximo de 14%
Extrato etéreo	0,66 ± 0,05	-
Cafeína	2,83 ± 0,11	Mínimo 2%
Acidez titulável (mL de NaOH 1N/ 100 g)	308,88 ± 0,29	-
Fibra alimentar solúvel	19,54 ± 2,20	-

Fonte: Da autora (2021).

Tabela 3 – Compostos fenólicos totais por Folin–Ciocalteu e capacidade antioxidante do café solúvel por ABTS e DPPH.

Ensaio	Café solúvel
Folin-Ciocalteu (g ácido gálico/100 g)	12,31 ± 0,14
ABTS (g Trolox/100 g)	20,57 ± 1,29
DPPH IC ₅₀ (µg/mL)	22,76 ± 0,12

Fonte: Da autora (2021).