



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

**LAENIA ANGÉLICA ANDRADE LOPES**

***Lactobacillus acidophilus* La-05 MICROENCAPSULADO EM ALGINATO E  
QUITOSANA: SOBREVIVÊNCIA EM BEBIDAS LÁCTEAS E NÃO LÁCTEAS E  
INCORPORAÇÃO EM CREME DE RICOTA CAPRINO**

Recife

2020

LAÊNIA ANGÉLICA ANDRADE LOPES

***Lactobacillus acidophilus* La-05 MICROENCAPSULADO EM ALGINATO E  
QUITOSANA: SOBREVIVÊNCIA EM BEBIDAS LÁCTEAS E NÃO LÁCTEAS E  
INCORPORAÇÃO EM CREME DE RICOTA CAPRINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Nutrição, com área de concentração em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Thayza Christina Montenegro Stamford

Coorientadoras: Profa. Dra. Marciane Magnani

Profa. Dra. Rafaela de Siqueira Ferraz Carvalho

Recife

2020



LAÊNIA ANGÉLICA ANDRADE LOPES

***Lactobacillus acidophilus* La-05 MICROENCAPSULADO EM ALGINATO E  
QUITOSANA: SOBREVIVÊNCIA EM BEBIDAS LÁCTEAS E NÃO LÁCTEAS E  
INCORPORAÇÃO EM CREME DE RICOTA CAPRINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Nutrição.

Aprovada em: 27/08/2020.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Rafaela de Siqueira Ferraz Carvalho  
(Departamento de Cirurgia, UFPE)

---

Profa. Dra. Tânia Lúcia Montenegro Stamford  
(Departamento de Nutrição, UFPE)

---

Prof. Dr. Eduardo José Nepomuceno Montenegro  
(Departamento de Fisioterapia, UFPE)

---

Profa. Dra. Tatiana Colombo Pimentel  
(Campus Paranaíba, Instituto Federal do Paraná)

---

Profa. Dra. Sara Baptista da Silva  
(Universidade Católica Portuguesa)

Dedico esta conquista a Jesus, autor e consumidor da minha fé. Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas. Aos meus pais, Cristina e Nilson (in memoriam), que sempre serão a minha inspiração e a minha eterna saudade. A minha família pelo amor, paciência e apoio doados a mim em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

A Jesus por ter me permitido viver toda essa caminhada, me amando, me dando forças e me guiando. A Ele toda honra e toda glória.

Aos meus pais Nilson e Cristina (*in memoriam*). Os poucos anos que vivemos juntos foram suficientes para que me ensinassem o verdadeiro sentido da vida, vocês sempre serão o meu orgulho e a minha inspiração e eu viverei para que jamais sejam esquecidos.

À minha família que sempre esteve presente me apoiando em todos os momentos, que independente dos meus erros e acertos sempre me amaram e me receberam de braços abertos. Vocês nunca duvidaram do meu potencial e eu serei eternamente grata.

À Laise e Glauber por serem exemplo de família, por me darem sobrinhos tão lindos e que tanto amo e por não me deixarem esquecer que sempre tive um lugar para voltar e chamar de lar. Laise você é minha irmã, mãe e melhor amiga e se eu consegui chegar aqui é porque você acreditou em mim.

Ao meu esposo e amigo, Carlos Alberto, pelos conselhos nos momentos de dificuldades, pelas palavras de incentivo nos momentos de desânimo e pela compreensão quando estive ausente. O seu amor e cuidado me fortaleceram. Essa conquista é nossa, conseguimos! Aos meus sogros, Cícero e Socorro, que me tem como filha, e aos meus cunhados, Ana Carla e Marcel, que considero como irmãos, obrigada por todo o amor e cuidado.

Às amigas Yana, Islânia, Germana e Vanessa que mesmo distantes sempre estiveram presentes em minha vida, o carinho por vocês só se fortaleceu. As minhas grandes amigas Sonalle e Adma que ao longo desses últimos seis anos de pós-graduação caminharam ao meu lado, sem vocês tudo teria sido mais difícil. Obrigada por sempre estarem disponíveis a me ouvir, me aconselhar e me ajudar sendo suporte, afeto, consolo, ânimo e força quando precisei. Também não poderia deixar de mencionar minhas amigas Yasmim, Elaine e Luana que desde a graduação tem estado presentes em minha vida.

Às amigas que o doutorado me deu, Francieli, Bernadete e Ana Júlia pelas divertidas viagens a Recife, pelos conselhos, risos e lágrimas compartilhadas, foi muito bom trilhar esse caminho com vocês. À minha grande amiga e aluna de iniciação

científica, Isabella Portela, por todo apoio, dedicação e compromisso com as análises laboratoriais desta pesquisa, obrigada pelo seu carinho e companheirismo.

Às amigas do laboratório de Análises Microbianas em Alimentos, Whyara, Geany, Iara, Bianca, Danieli, Elvira, Keythy, Larissa, Viviane, Winnie, Janne, Ruthchelly e Mayara. Foi maravilhoso compartilhar com vocês todos esses anos, quero agradecer não só pelos ensinamentos técnico-científicos, mas por todos os risos, choros, abraços e desabafos. Encontrei em vocês amor, empatia, solidariedade, união e perseverança. Também não posso deixar de agradecer as que já foram parte dessa grande família e que hoje alçam vôos mais altos: Jéssica Guedes, Flávia, Myrella e Rayssa, sou muito grata por tudo o que vivi e aprendi com cada uma de vocês. Às amigas Bianca, Helena e Jéssica Bezerra que com amor e generosidade doaram o seu tempo e me ajudaram na realização das análises sensoriais.

À minha orientadora Profa. Dra. Thayza Stamford que mesmo sem me conhecer aceitou me orientar. Eu só tenho a te agradecer por ter confiado no meu trabalho e por ter me acompanhado durante esses quatro anos, sempre estando disposta a me ajudar. Obrigada pelo apoio, paciência e disponibilidade dedicados a mim e a nossa pesquisa. À senhora meu respeito e gratidão.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Rafaela Carvalho que aceitou o desafio de produzir as nossas micropartículas probióticas. Obrigada por sua dedicação e por sua paciência em me orientar e aconselhar, por sempre me receber em Recife e no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) de braços abertos e por ter me permitido viver essa experiência.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Marciane Magnani que tem me acompanhado desde o mestrado. Obrigada por abrir as portas do seu laboratório, por acreditar no meu potencial quando muitos duvidaram, por interceder por mim, por sempre estar disponível a me ouvir, me aconselhar e me ensinar. Receba o meu carinho, respeito e admiração.

À Profa. Dra. Tatiana Pimentel pelo apoio técnico-científico e redação dos artigos. A senhora foi essencial na finalização deste trabalho, deixo aqui a minha admiração e carinho.

Aos Profs. Drs. Carlos Barão (IFPR), Nereide Magalhães (UFPE), Marta Madruga, Janeeyre Maciel, e Taliana Bezerra (UFPB) por disponibilizem seus laboratórios para execução das análises e pelas importantes contribuições para o desenvolvimento deste estudo.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá (COMCAP/UEM), ao Laboratório de Análises Químicas de Alimentos da UFPB e ao Laboratório de Processamento de leite e derivados pela infraestrutura.

Aos técnicos de laboratório do setor de Engenharia de Alimentos da UFPB: Gilvandro, Claudionor, Mércia, Leila, Lorena, Wilma e Ana Tereza. Obrigada pela atenção, disponibilidade e amizade. Vocês foram de fundamental importância para a execução das análises.

Aos Professores da Pós-Graduação em Nutrição da UFPE pelos ensinamentos transmitidos.

Aos serviços prestados pela secretaria da Pós-Graduação em Nutrição da UFPE, em especial à servidora Cecília que sempre me acolheu com tanto carinho.

À CAPES pelo suporte financeiro.

À FACEPE pela bolsa de doutorado a mim concedida.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Sabemos que Deus age em todas as coisas para o bem daqueles que o amam, dos que foram chamados de acordo com o seu propósito.”

(ROMANOS 8:28).

## RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La-05 microencapsulado durante armazenamento refrigerado, sob condições de estresse (temperatura, pH e NaCl) e quando exposto às condições gastrointestinais simuladas em leites caprino, bovino e em extratos hidrossolúveis de arroz e soja, bem como desenvolver e caracterizar um creme de ricota caprino adicionado de probiótico microencapsulado. *L. acidophilus* La-05 foi microencapsulado pela técnica de gelificação iônica externa em alginato (3%; MA) e alginato revestido de solução de quitosana de baixo peso molecular a 0,5% (MAQ5) e a 0,7% (MAQ7). As MA e MAQ5 liofilizadas foram referidas como MAL e MAQL, respectivamente. As micropartículas foram avaliadas por microscopia óptica e se mostraram íntegras, dispersas sem aglomeração e com formato esférico. A microscopia eletrônica de varredura mostrou que o revestimento de quitosana tornou a estrutura das micropartículas de alginato menos porosa e mais estável. Os resultados revelaram uma alta eficiência de encapsulação de 99,27% para MA, 99,33% para MAQ5, 92,68% para MAL e 91,87% para MAQL. A microencapsulação proporcionou maior proteção ( $p < 0,05$ ) a cepa probiótica (reduções de ~ 1 log UFC/mL) durante armazenamento a 7 °C (28 dias para MA e MAQ5 e 120 dias para MAL e MAQL), tratamento térmico (72, 85 e 90 °C), NaCl (1,0; 1,5 e 2,0% durante 1,2 e 3 h) e pH (2, 4, 6 durante 1, 2 e 3 h) em comparação com as células livres (reduções de ~ 3, 4, 2 e 3 log UFC/mL, respectivamente). Quando exposto ao trato gastrointestinal simulado, a cultura probiótica microencapsulada (MAL e MAQL) incorporada nos leites caprino e bovino e nos extratos hidrossolúveis de arroz e soja também apresentaram maior sobrevivência ( $p < 0,05$ ) da cepa (redução de ~ 1 UFC/mL) em comparação com as células livres (diminuição de ~ 3 log UFC/mL). Os dados mostraram que os extratos hidrossolúveis vegetais foram veículos tão apropriados quanto os leites caprino e bovino para serem veículos de probióticos. Com relação ao creme de ricota caprino, os resultados revelaram que a microencapsulação da cepa probiótica (MAL e MAQL) resultou em maior sobrevivência ( $> 6$  log UFC/mL) durante o armazenamento (7 °C por 7 dias) e em condições gastrointestinais simuladas ( $p < 0,05$ ) do que as células em sua forma livre. Os parâmetros de qualidade do creme de ricota caprino adicionado de *L. acidophilus* La-05 em MAL e MAQL durante o armazenamento (7 °C / 7 dias) foram aprimorados: sem perda de umidade, menor proteólise, menor produção de ácidos

orgânicos, textura com menos elasticidade e adesividade e perfil volátil composto por notas florais e frutadas e aroma "caprino" menos pronunciado. Esses achados mostram que a microencapsulação em matriz de alginato-quitosana pode ser uma metodologia mais eficaz para preservar a viabilidade de probióticos, além de melhorar os parâmetros de qualidade de produtos lácteos e não lácteos.

**Palavras-chave:** Alimento funcional. Probióticos. Laticínios. Extratos vegetais. Biopolímeros.

## ABSTRACT

This work aimed to evaluate the viability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* La-05 during cold storage, under stress conditions (temperature, pH and NaCl) and when exposed to simulated gastrointestinal conditions in goat and bovine milks and water-soluble extracts of rice and soy, as well as developing and characterizing a goat ricotta paste with microencapsulated probiotic. *L. acidophilus* La-05 was microencapsulated by the technique of external ion gelation in alginate (3%; AM) and alginate coated with low molecular weight chitosan solution at 0.5% (AC5M) and 0.7 % (AC7M). The freeze-dried AM and AC5M were referred to as FAM and FACM, respectively. The microparticles were evaluated by optical microscopy and showed to be intact, dispersed without agglomeration and spherical shape. Scanning electron microscopy showed that the chitosan coating made the structure of alginate microparticles less porous and more stable. The results revealed a high encapsulation efficiency of 99.27% for AM, 99.33% for AC5M, 92.68% for FAM and 91.87% for FACM. Microencapsulation provided greater protection ( $p < 0.05$ ) to the probiotic strain (reductions of  $\sim 1$  log CFU/mL) during storage at 7 °C (28 days for AM and AC5M, and 120 days for FAM and FACM), heat treatment (72, 85 and 90 °C), NaCl (1.0; 1.5 and 2.0% for 1.2 and 3 h) and pH (2, 4, 6 for 1, 2 and 3 h) compared to the free cells (reductions of  $\sim 3, 4, 2$  and  $3$  log CFU/mL, respectively). When exposed to the simulated gastrointestinal tract, the microencapsulated probiotic culture (FAM and FACM) incorporated in goat and bovine milk and water-soluble extracts of rice and soy also showed higher survival ( $p < 0.05$ ) of the strain (reduction of  $\sim 1$  CFU/mL) compared to the free cells (decrease of  $\sim 3$  log CFU/mL). The data showed that water-soluble extracts of plant were vehicles as appropriate as goat and bovine milks to be vehicles of probiotics. Regarding goat ricotta paste, the results revealed that the microencapsulation of the probiotic strain (FAM and FACM) resulted in greater survival ( $> 6$  log CFU/mL) during storage (7 °C for 7 days) and in simulated gastrointestinal conditions ( $p < 0.05$ ) than cells in free form. The quality parameters of the goat ricotta paste added by *L. acidophilus* La-05 in FAM and FACM during storage (7 °C/7 days) were improved: without loss of moisture, less proteolysis, less production of organic acids, texture with less elasticity and adhesiveness and volatile profile composed of floral and fruity notes and a less pronounced "goaty" aroma. These findings show that alginate-chitosan matrix microencapsulation can be a more effective methodology to

preserve the viability of probiotics without negatively affecting the quality parameters of dairy and non-dairy products.

**Keywords:** Functional food. Probiotics. Dairy products. Plant extracts. Biopolymers.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Produtos lácteos e não lácteos contendo probióticos.....	29
Figura 2 –	Diferença entre microcápsulas e microesferas.....	30
Figura 3 –	Ilustração da produção de micropartículas através do encapsulador B-395 Pro (BUCHI, Suíça) pela técnica de gelificação iônica externa.....	33
Figura 4 –	Estrutura química do alginato de sódio e seus dois componentes monoméricos: grupo manurônico (M) e grupo gulurônico (G).....	34
Figura 5 –	Estrutura química do modelo caixa de ovo formado pela interação entre os íons carboxilato das unidades de guluronato do alginato de sódio e os íons $Ca^{2+}$ .....	35
Figura 6 –	Estrutura química da quitosana.....	36
Figura 7 –	Ilustração de micropartícula formada por matriz de alginato com revestimento de quitosana e a estrutura química correspondente a interação eletrostática entre o alginato de cálcio e a quitosana.....	36
Figura 8 –	Produção de micropartículas de alginato através do encapsulador B-395 Pro pela técnica de gelificação iônica externa.....	46
Figura 9 –	Processamento do extrato hidrossolúvel de arroz: a) molho do grão de arroz; b) trituração do grão de arroz; c) aquecimento do extrato hidrossolúvel de arroz; d) extrato hidrossolúvel de arroz preparado .....	51
Figura 10 –	Processamento do extrato hidrossolúvel de soja: a) molho do grão de soja; b) trituração do grão de soja; c) aquecimento do extrato hidrossolúvel de soja; d) extrato hidrossolúvel de soja preparado.....	51
Figura 11 –	Fluxograma de produção da ricota cremosa caprina adicionada de probiótico microencapsulado.....	54

Figura 12 – Processamento do creme de ricota caprino: a) Soro de leite caprino em aquecimento; b) Floculação da massa; c) Creme de ricota de cabra preparado.....	55
Figura 13 – Imagens de microscopia óptica das micropartículas com aumento de 25x: a) micropartículas de alginato b) micropartículas de alginato revestidas de quitosana (0,5%).....	64
Figura 14 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas com aumento de 500x: a) micropartículas de alginato liofilizadas (MAL) b) micropartículas de alginato revestidas de quitosana liofilizadas (MAQL).....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Contagem (log UFC/mL) de células viáveis antes e após a microencapsulação de <i>L. acidophilus</i> La-05 e a eficiência de encapsulação.....	66
Tabela 2 – Contagem (log UFC/mL) de <i>L. acidophilus</i> La-05 microencapsulado durante 28 dias de armazenamento refrigerado (7 °C).....	67
Tabela 3 – Contagem (log UFC/mL) de <i>L. acidophilus</i> La-05 em micropartículas liofilizadas durante 120 dias de armazenamento refrigerado (7 °C).....	67
Tabela 4 – Contagem (log UFC/mL) de <i>L. acidophilus</i> La-05 em micropartículas liofilizadas expostas a diferentes condições de estresse.....	70
Tabela 5 – Características físico-químicas de extratos hidrossolúveis de arroz e soja durante 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C).	73
Tabela 6 – Contagem (log UFC/mL) de <i>L. acidophilus</i> La-05 microencapsulado incorporado em extratos hidrossolúveis de arroz e soja durante 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C).	74
Tabela 7 – Condições usadas durante a simulação do trato gastrointestinal e a contagem (log UFC/mL) de <i>L. acidophilus</i> microencapsulado incorporado em extratos hidrossolúveis de soja e arroz e em leites caprino e bovino após 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C).....	77
Tabela 8 – Contagem (log UFC/mL) de <i>L. acidophilus</i> La-05 microencapsulado incorporado em creme de ricota caprino durante 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C).....	79
Tabela 9 – Condições usadas durante a simulação do trato gastrointestinal e a contagem (log UFC/mL) de <i>L. acidophilus</i> microencapsulado incorporado em creme de ricota caprino após 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C).....	81

Tabela 10 – Rendimento, atividade de água, pH, acidez e composição centesimal do creme de ricota caprino durante 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C).....	83
Tabela 11 – Proteólise do creme de ricota caprino durante 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C).....	85
Tabela 12 – Perfil de textura e cor do creme de ricota caprino durante 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C).....	87
Tabela 13 – Perfil de açúcares e ácidos orgânicos do creme de ricota caprino durante 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C).....	88
Tabela 14 – Perfil de ácidos graxos (g/100g) do creme de ricota caprino durante 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C).....	91
Tabela 15 – Perfil de voláteis do creme de ricota caprino durante 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C).....	96
Tabela 16 – Aceitação sensorial e intenção de compra do creme de ricota caprino após 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C).....	99

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>24</b>
2.1	PROBIÓTICOS.....	24
<b>2.1.1</b>	<b>Gênero <i>Lactobacillus</i>.....</b>	<b>26</b>
2.2	ALIMENTOS PROBIÓTICOS.....	27
2.3	TECNOLOGIA DE MICROENCAPSULAÇÃO.....	29
<b>2.3.1</b>	<b>Técnica de gelificação iônica por extrusão.....</b>	<b>31</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Material microencapsulante.....</b>	<b>33</b>
2.3.2.1	Alginato.....	33
2.3.2.2	Quitosana.....	35
2.4	EXTRATOS HIDROSSOLÚVEIS VEGETAIS.....	37
2.5	LEITE BOVINO E CAPRINO.....	38
2.6	PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DO QUEIJO RICOTA.....	40
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE.....</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
4.1	OBJETIVO GERAL.....	44
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
5.1	MICRO-ORGANISMO E OBTENÇÃO DO INÓCULO.....	45
5.2	MICROENCAPSULAÇÃO DE <i>L. acidophilus</i> La-05 PELA TÉCNICA DE GELIFICAÇÃO IÔNICA EXTERNA.....	45
5.3	REVESTIMENTO DAS MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO COM QUITOSANA.....	46
5.4	LIOFILIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE <i>L. acidophilus</i> La-05	47
5.5	CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS.....	47
5.6	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE <i>L. acidophilus</i> La-05.....	48
5.7	VIABILIDADE DE <i>L. acidophilus</i> La-05 MICROENCAPSULADO DURANTE ARMAZENAMENTO.....	48
5.8	VIABILIDADE DE <i>L. acidophilus</i> La-05 MICROENCAPSULADO SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE.....	49

5.8.1	<b>Viabilidade de <i>L. acidophilus</i> La-05 microencapsulado durante exposição ao estresse térmico.....</b>	<b>49</b>
5.8.2	<b>Viabilidade de <i>L. acidophilus</i> La-05 microencapsulado durante exposição a diferentes concentrações de NaCl.....</b>	<b>49</b>
5.8.3	<b>Viabilidade de <i>L. acidophilus</i> La-05 microencapsulado durante exposição a diferentes valores de pH.....</b>	<b>50</b>
5.9	OBTENÇÃO DOS LEITES CAPRINO E BOVINO E DOS EXTRATOS HIDROSSOLÚVEIS DE ARROZ E SOJA ADICIONADOS DE <i>L. acidophilus</i> La-05 MICROENCAPSULADO.....	50
5.10	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS EXTRATOS HIDROSSOLÚVEIS DE ARROZ E SOJA E VIABILIDADE DE <i>L. acidophilus</i> La-05 MICROENCAPSULADO DURANTE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO.....	52
5.11	VIABILIDADE DE <i>L. acidophilus</i> La-05 MICROENCAPSULADO INCORPORADO EM EXTRATOS HIDROSSOLÚVEIS VEGETAIS, LEITES CAPRINO E BOVINO EXPOSTOS AO TRATO GASTROINTESTINAL SIMULADO.....	52
5.12	FABRICAÇÃO DO CREME DE RICOTA CAPRINO.....	53
5.12.1	<b>Análises microbiológicas e viabilidade de <i>L. acidophilus</i> La-05 microencapsulado durante armazenamento refrigerado.....</b>	<b>53</b>
5.12.2	<b>Viabilidade de <i>L. acidophilus</i> La-05 microencapsulado incorporado em creme de ricota caprino exposto ao trato gastrointestinal simulado.....</b>	<b>56</b>
5.12.3	<b>Avaliação do rendimento e sinerese do creme de ricota caprino.....</b>	<b>57</b>
5.12.4	<b>Análises de pH, acidez, atividade de água e composição centesimal do creme de ricota caprino.....</b>	<b>57</b>
5.12.5	<b>Análise de proteólise do creme de ricota caprino.....</b>	<b>57</b>
5.12.6	<b>Análise de textura e cor instrumental do creme de ricota caprino.....</b>	<b>58</b>
5.12.7	<b>Análise do perfil de açúcares e ácidos orgânicos do creme de ricota caprino.....</b>	<b>58</b>
5.12.8	<b>Análise do perfil de ácidos graxos do creme de ricota caprino.....</b>	<b>59</b>
5.12.9	<b>Análise do perfil de voláteis do creme de ricota caprino.....</b>	<b>60</b>
5.12.10	<b>Análise sensorial.....</b>	<b>61</b>

5.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	62
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
6.1	CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS.....	63
6.2	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE <i>L. acidophilus</i> La-05.....	65
6.3	VIABILIDADE DE <i>L. acidophilus</i> La-05 MICROENCAPSULADO DURANTE ARMAZENAMENTO.....	66
6.4	VIABILIDADE DE <i>L. acidophilus</i> La-05 MICROENCAPSULADO DURANTE EXPOSIÇÃO A DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE.....	68
6.5	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS EXTRATOS HIDROSSOLÚVEIS DE ARROZ E SOJA E VIABILIDADE DE <i>L. acidophilus</i> La-05 MICROENCAPSULADO DURANTE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO.....	71
6.6	VIABILIDADE DE <i>L. acidophilus</i> La-05 MICROENCAPSULADO INCORPORADO EM EXTRATOS HIDROSSOLÚVEIS VEGETAIS, LEITES CAPRINO E BOVINO EXPOSTOS AO TRATO GASTROINTESTINAL SIMULADO.....	74
6.7	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E VIABILIDADE DE <i>L. acidophilus</i> La-05 MICROENCAPSULADO INCORPORADO EM CREME DE RICOTA CAPRINO DURANTE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO.....	79
6.8	VIABILIDADE DE <i>L. acidophilus</i> La-05 MICROENCAPSULADO INCORPORADO EM CREME DE RICOTA CAPRINO EXPOSTO AO TRATO GASTROINTESTINAL SIMULADO.....	80
6.9	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL, RENDIMENTO, PH, ACIDEZ E ATIVIDADE DE ÁGUA DO CREME DE RICOTA CAPRINO.....	81
6.10	ANÁLISE DE PROTEÓLISE DO CREME DE RICOTA CAPRINO.....	84
6.11	ANÁLISE DE TEXTURA E COR INSTRUMENTAL DO CREME DE RICOTA CAPRINO.....	85
6.12	ANÁLISE DO PERFIL DE AÇÚCARES E ÁCIDOS ORGÂNICOS DO CREME DE RICOTA CAPRINO.....	88
6.13	ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO CREME DE RICOTA CAPRINO.....	89

6.14	ANÁLISE DO PERFIL DE VOLÁTEIS DO CREME DE RICOTA CAPRINO.....	94
6.15	ANÁLISE SENSORIAL DO CREME DE RICOTA CAPRINO.....	99
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>100</b>
	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>101</b>
	<b>APÊNDICE A - FORMULÁRIO DO TESTE DE ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA DO CREME DE RICOTA CAPRINO.....</b>	<b>124</b>
	<b>APÊNDICE B - FORMULÁRIO DO TESTE DE ORDENAÇÃO - PREFERÊNCIA.....</b>	<b>126</b>
	<b>APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....</b>	<b>127</b>
	<b>APÊNDICE D - ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO FOOD RESEARCH INTERNATIONAL (ISSN 0963-9969).....</b>	<b>129</b>
	<b>ANEXO A - COMPROVANTE DE ACEITE DO ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO FOOD RESEARCH INTERNATIONAL (ISSN 0963-9969).....</b>	<b>138</b>
	<b>ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.....</b>	<b>139</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (HILL et al., 2014). Dentre os benefícios do uso de probióticos estão a redução do colesterol (DING et al., 2017), modulação da microbiota intestinal e prevenção de doenças gastrointestinais (MUGARAB-SAMEDIA et al., 2017), e auxílio no tratamento da obesidade e diabetes mellitus (BAGAROLLI et al., 2017).

O gênero *Lactobacillus* é citado como o micro-organismo probiótico mais utilizado na produção de alimentos funcionais (LI et al., 2020), com destaque para a espécie *Lactobacillus acidophilus* empregada em matrizes alimentares lácteas (ABDOLLAHZADEH et al., 2018; BARBOSA et al., 2016; FAZILAH et al., 2018) e não lácteas (LUCIANO et al., 2018; MAJEED et al., 2018).

Os micro-organismos em sua forma livre podem ser suscetíveis a estresses ambientais e ao processo digestivo, ocorrendo um declínio na viabilidade celular durante o armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal (ASHWAR ET AL., 2018; BARBOSA; TEIXEIRA, 2017; SHORI, 2015).

A microencapsulação tem sido proposta para proteger os micro-organismos probióticos de condições hostis, como ambiente aeróbico, pH ácido e enzimas digestivas, permitindo que um maior número de células viáveis cheguem ao intestino (ASHWAR ET AL., 2018; CHEN et al., 2017; DARJANI et al., 2016; DE PRISCO et al., 2015; MATOS-JR et al., 2019; PATRIGNANI et al., 2017). Além de impedir que os probióticos modifiquem as características físico-químicas e sensoriais dos alimentos (RIBEIRO et al., 2014; ROLIM et al., 2020).

Entre as técnicas utilizadas para microencapsulação de culturas probióticas, a gelificação iônica externa é a mais utilizada por necessitar de condições simples e acessíveis para a produção de micropartículas e por não utilizar alta temperatura ou solvente (POLETTTO et al., 2019). O alginato é um dos biopolímeros mais utilizados para o microencapsulamento de probióticos, pois apresenta baixo custo, é simples de execução, biocompatível, biodegradável e reconhecido como seguro para consumo. Entretanto, a natureza porosa do gel de alginato pode permitir que umidade, suco gástrico e outros fluidos entrem na micropartícula, reduzindo a proteção contra fatores ambientais adversos (LIU et al., 2017).

Assim, materiais como a quitosana tem sido utilizados para revestir a micropartícula de alginato, a fim de torná-la menos porosa e mais estável (ETCHEPARE et al., 2016; RATHER et al., 2017). A quitosana é um polímero catiônico obtido a partir da quitina (extraída de crustáceos) ou, ainda, da parede celular de fungos. É um polissacarídeo biocompatível, biodegradável com propriedades mucoadesivas que otimizam a penetração de macromoléculas pelas barreiras intestinais (GEORGE; ABRAHAM, 2006; KANMANI et al., 2011).

Micropartículas contendo probióticos têm sido adicionadas em produtos lácteos, como leites fermentados (PATRIGNANI et al., 2017), sorvetes (DE FARIAS et al., 2019), iogurtes (RIBEIRO et al., 2014) e queijos (NINGTYAS et al., 2019). O leite de cabra tem obtido notoriedade por ser nutritivo e por suas propriedades sensoriais características (QUEIROGA et al., 2013).

O interesse no desenvolvimento de novos produtos utilizando soro de leite de cabra está associado ao seu alto valor nutricional (principalmente devido ao seu teor de proteínas), aceitação sensorial por ter um menor teor de ácidos graxos de cadeia curta (responsáveis pelo sabor peculiar dos produtos caprinos), além de ser uma forma eficiente e ecológica de aproveitamento (BORBA et al., 2013; MEIRA et al., 2015; ROLIM et al., 2020). O queijo ricota destaca-se entre estes produtos por ser um queijo suave, com baixo teor de sal e gordura. Além disso, suas propriedades físico-químicas podem torná-lo um ambiente favorável para a sobrevivência de microorganismos probióticos (BORBA et al., 2013; MEIRA et al., 2015; SATTIN et al., 2016).

Contudo, devido ao aumento do vegetarianismo, bem como uma redução no consumo de produtos lácteos, principalmente por indivíduos hipercolesterolêmicos, intolerantes à lactose e alérgicos ao leite, as matrizes vegetais têm sido sugeridas como potenciais veículos de probióticos (KANDYLIS et al., 2016; PANGHAL et al., 2018). Os consumidores têm buscado por produtos que substituam o leite e a principal estratégia da indústria de alimentos tem sido a comercialização de extratos hidrossolúveis a base de vegetais como amêndoa, coco, grão de bico, aveia, arroz e soja (RINCON; BOTELHO; ALENCAR, 2020). Até onde se sabe, não há estudos prévios que tenham avaliado a incorporação da cultura probiótica de *L. acidophilus* La-05 livre e microencapsulada em leite de arroz e soja e em creme de ricota caprino.

Considerando os aspectos acima citados, este estudo inicialmente avaliou a viabilidade de *L. acidophilus* La-05 livre e encapsulado em micropartículas de alginato e micropartículas de alginato revestido com quitosana sob diferentes condições de

estresse e quando expostos às condições gastrointestinais simuladas em leites caprino, bovino e em extratos hidrossolúveis vegetais de arroz e soja. Posteriormente, houve um enfoque no desenvolvimento de um creme de ricota caprino com *L. acidophilus* La-05 microencapsulado, que foi analisado quanto a viabilidade do probiótico e das características de qualidade do produto.

A consolidação desta pesquisa está trazendo novos dados acerca do tema de estudo, e possibilitando o desenvolvimento e a fundamentação metodológica para o planejamento e execução de pesquisas com ênfase na potencialidade probiótica de bactérias ácido-láticas. Assim como, o emprego em matrizes alimentares vegetais (extratos hidrossolúveis de arroz e soja) e animais (leite bovino, leite e queijo caprino), agregando a esses produtos elevado valor nutritivo e benefícios à saúde do consumidor.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 PROBIÓTICOS

A história dos probióticos começou em 1908, quando um cientista russo chamado Élie Metchnikoff observou que a bactéria contida no iogurte ajudava a controlar as infecções causadas por patógenos entéricos e controlava o quadro de toxemia, estabelecendo uma ligação entre saúde e longevidade com o consumo de iogurte (ESPITIA et al., 2016). Entretanto, o termo probiótico foi usado pela primeira vez por Kollath (1953), derivado do latim e do grego significa "para a vida". Lilley e Stillwell (1965) foram os primeiros a conceituar os probióticos ao citar as bactérias lácticas como micro-organismos que causam o crescimento de outro micro-organismo. Em 1974, o termo foi usado por Parker em um sentido mais amplo para se referir a interações de micro-organismos com o hospedeiro animal ou humano, ou seja, "organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal" (ESPITIA et al., 2016). Atualmente, a legislação brasileira define probióticos como "micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do indivíduo" (BRASIL, 2018).

Cada ser humano possui uma assinatura única que podem ir de 100 a 1000 espécies microbianas no trato gastrointestinal. As células microbianas compreendem metade do peso úmido do material do cólon e sua quantidade excede em 10 vezes o número de células do tecido que formam o corpo humano. A colonização bacteriana intestinal depende de uma interação complexa e dinâmica entre a dieta, o genoma e o estilo de vida do indivíduo, além do uso de antibióticos (KERRY et al., 2018).

Os probióticos apresentam atividades benéficas em diversas doenças como diabetes (RAZMPOOSH et al., 2019), obesidade (EJTAHED et al., 2019), hipercolesterolemia (SANGWAN; SINGH, 2018), câncer (DASARI et al., 2017) e principalmente nas doenças gastrointestinais (FLOCH, 2018). Esses efeitos na saúde são derivados de diversas formas de ações dos probióticos na microbiota intestinal. Um dos principais mecanismos dos probióticos é o chamado efeito barreira que confere proteção contra micro-organismos patogênicos (KERRY et al., 2018; RAO et al., 2016). Os impactos positivos dos probióticos na função da barreira intestinal têm relevância para uma série de condições que vão desde a síndrome do intestino irritável até a doença inflamatória intestinal (QUIGLEY, 2019).

Os probióticos podem inibir patógenos pela produção de ácidos graxos de cadeia curta: acético, propiônico e butírico que ajudam a manter um pH apropriado no lúmen intestinal (TEJERO-SARINENA et al., 2013). Além disso, podem produzir uma variedade de compostos antimicrobianos, como bacteriocinas, etanol, ácidos orgânicos, diacetil, acetaldeídos, peróxido de hidrogênio e peptídeos (ISLAM, 2016). Outro mecanismo pelo qual os probióticos exercem atividade antagonista aos patógenos é por meio de competição por receptores e locais de ligação (KERRY et al., 2018).

Os probióticos também estimulam, modulam e regulam a resposta imune iniciando a ativação de genes específicos de células hospedeiras. Estes micro-organismos modulam a liberação de hormônios gastrointestinais e regulam o comportamento do cérebro através da sinalização neuronal bidirecional, como parte do eixo intestino-cérebro (KRISTENSEN et al., 2016). Ainda, probióticos estão envolvidos na indução da angiogênese intestinal pela sinalização do receptor do fator de crescimento endotelial vascular que, por sua vez, regula a inflamação aguda e crônica no tecido da mucosa intestinal causada pela progressão de doenças inflamatórias intestinais (BAKIRTZI et al., 2016).

O mercado global de probióticos, incluindo seu uso como ingredientes, suplementos e incorporação em produtos alimentícios, foi avaliado em cerca de 24,8 bilhões de euros em 2011, mais de 31,1 bilhões de euros em 2015 e se estima que atinja cerca de 43 bilhões de euros até 2020 (ASPRI; PAPADEMAS; TSALTAS, 2020; ESPITIA et al., 2016). Isso despertou a atenção da indústria alimentícia na produção de novos produtos contendo probióticos, bem como de pesquisadores para estudarem características específicas dos probióticos e seus efeitos sobre a saúde humana (BEHERA; PANDA, 2020; ESPITIA et al., 2016; TANGYU et al., 2019). Os probióticos podem ser consumidos na forma de nutracêuticos, adicionados aos alimentos como parte de um processo de fermentação ou por suplementação (ANVISA, 2016; ASPRI; PAPADEMAS; TSALTAS, 2020; BEHERA; PANDA, 2020; MENEZES et al., 2013; RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010; TANGYU et al., 2019).

Os probióticos mais importantes na produção, processamento e preservação de diversos produtos alimentícios são as bactérias ácido lácticas (BAL). As BAL aprimoram as propriedades sensoriais dos alimentos e inibem o crescimento de micro-organismos deteriorantes, proporcionando maior estabilidade aos alimentos (BURGAIN et al., 2011; CROSS, 2002; LÜCKE, 2000).

BAL são bactérias gram-positivas, anaeróbias facultativas ou estritas, não formadoras de esporos e fermentadoras de açúcar produzindo principalmente o ácido láctico. Filogeneticamente, apenas as bactérias da ordem Lactobacillales podem ser denominadas BAL, entre os principais gêneros que compõe a ordem Lactobacillales estão os *Lactobacillus* (HOLZAPFEL; WOOD, 2014). BAL estão adaptadas a meios ricos em nutrientes como leite, carne ou frutas, possuindo um eficiente metabolismo de carboidratos. Contudo, apresentam uma dependência exógena de aminoácidos, precursores de ácidos nucleicos e vitaminas (SAUER et al., 2017). *L. acidophilus* é uma das espécies de BAL mais frequentemente usada como probiótico (KANDYLIS et al., 2016).

### 2.1.1 Gênero *Lactobacillus*

Os lactobacilos em sua taxonomia são classificados como eubactérias que pertencem ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales, família Lactobacillaceae (LEBEER et al., 2008; SAUER et al., 2017). O gênero *Lactobacillus* foi proposto pela primeira vez em 1901 por Beijerinck e ao longo dos anos foi composto por mais de 250 espécies. Contudo, devido a diversidade na composição genética desses micro-organismos foi possível reclassificar esse gênero em grupos que possuíam características fisiológicas e metabólicas semelhantes, com o propósito de beneficiar pesquisas futuras sobre essas bactérias (ZHENG et al., 2020).

Assim, surgiram 25 gêneros de Lactobacillaceae (*Agrilactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Holzapfelia*, *Lacticaseibacillus*, *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Paucilactobacillus* e *Secundilactobacillus*) (ZHENG et al., 2020).

*Lactobacillus* é composto por espécies gram-positivas, homofermentativas, termofílicas e não formadoras de esporos. Compõe a microbiota do trato gastrointestinal humana e de animais diversos e comumente são usados na fermentação de alimentos, em especial produtos lácteos (ZHENG et al., 2020). São habitantes dominantes do intestino delgado humano, numerosas espécies estão categorizados como organismos "Geralmente Reconhecidos como Seguros" (GRAS)

da Food and Drug Administration (FDA) e também receberam o “status” de “Presunção Qualificada de Segurança” pela EFSA (European Food Safety Authority) por não serem patogênicos e nem aptos a transmitir para bactérias patogênicas os fatores de resistência a antimicrobianos (RAJOKA et al., 2017; TRIPATHI; GIRI, 2014).

Os principais obstáculos em adicionar os lactobacilos nas matrizes alimentares são as possíveis alterações de sabor e aroma no produto pela produção de metabólitos. Assim como, a manutenção da viabilidade celular devido a diversos fatores como a origem dos ingredientes, pH do alimento, técnica de processamento, tempo e temperatura de armazenamento (RATHER et al., 2017; SHORI, 2015; TRIPATHI; GIRI, 2014).

*L. acidophilus* é uma das espécies mais importantes do gênero *Lactobacillus*, principalmente por estarem presentes em alimentos fermentados e suplementos dietéticos que possuem apelo de promoção da saúde (OZOGUL; HAMED, 2016). A bactéria foi isolada pela primeira vez por Beijerinck em 1901 de fezes infantis e denominada de *Bacillus acidophilus*. Contudo, foi descrito adequadamente como *L. acidophilus* pela primeira vez em 1970 por Hansen e Møgelgaard, que o designaram como uma cepa neótipo (ATCC 4356) de acordo com as recomendações do Subcomitê Internacional de Taxonomia de Lactobacilos e Organismos Intimamente Relacionados (SELLE; KLAENHAMMER; RUSSELL, 2014).

*L. acidophilus* possui uma temperatura ideal de crescimento entre 35-40 °C e um pH ótimo entre 5,5 e 6,0 (SHAH, 2007). Embora a maioria das cepas sejam aerotolerantes, o crescimento ótimo é obtido sob condições microaerófilas ou anaeróbicas (OZOGUL; HAMED, 2016). Os benefícios à saúde associados a essa espécie incluem a redução dos sintomas gastrointestinais em indivíduos intolerantes à lactose (PAKDAMAN et al., 2016), alívio dos sintomas de constipação (YEUN; LEE, 2015), tratamento da diarreia (LEE et al., 2015), úlceras pépticas (YANG et al., 2012) e câncer de intestino (HIBBERD et al., 2017).

## 2.2 ALIMENTOS PROBIÓTICOS

Para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o uso de probióticos em alimentos necessita de comprovação da sua segurança e eficácia. A comprovação da segurança deve ser realizada por meio de estudos científicos que demonstrem um

histórico de uso seguro, ausência de eventos adversos, ausência de fatores de virulência e patogenicidade, ausência de produção de substâncias ou metabólitos que causem riscos à saúde do homem, ausência de resistência a antibióticos e susceptibilidade a, pelo menos, dois antibióticos. Os benefícios à saúde para os produtos adicionados de probióticos devem ser comunicados por meio da alegação de propriedade funcional aprovada para a linhagem. A comprovação do benefício requer demonstração da sobrevivência às condições do trato digestório e evidência de efeito benéfico em humanos obtida por meio de estudos (BRASIL, 2018).

Matrizes alimentares têm sido cada vez mais exploradas como veículos de cepas probióticas. Produtos lácteos têm obtido destaque por serem considerados apropriados para suplementação de micro-organismos devido a sua densidade de nutrientes (protegendo as células bacterianas) e a capacidade de tamponamento das suas proteínas que através dos seus grupos ácidos (ácido carboxílico) e básicos (aminas) resistem às mudanças de pH quando o pH é próximo ou igual ao seu pKa (MENNAH-GOVELA; SINGH; BORNHORST, 2019; RANADHEERA; NAUMOVSKI; AJLOUNI, 2018; RODRIGUES et al., 2019; ROLIM et al., 2020).

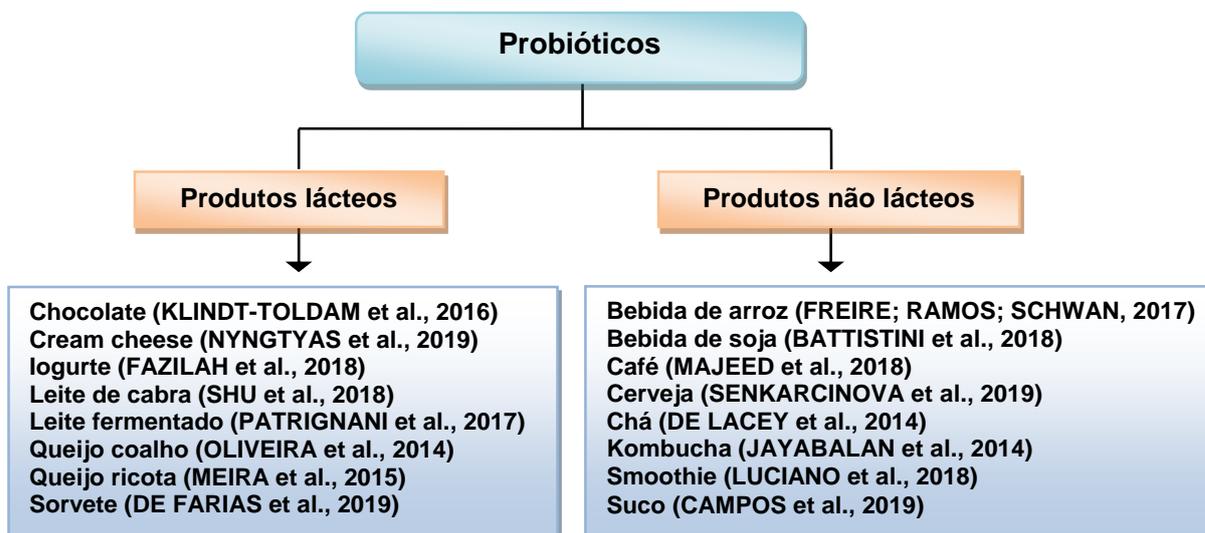
No entanto, problemas de saúde como intolerância a lactose, alergia a caseína e restrições ao colesterol restringem a ingestão de alimentos lácteos. Além disso, o crescimento do número de vegetarianos e o baixo custo para produzir produtos não lácteos, fazem das matrizes vegetais uma boa alternativa para a adição de probióticos (ESPITIA et al., 2016; KANDYLIS et al., 2016; PANGHAL et al., 2018). Na Figura 1 estão descritos exemplos de produtos lácteos e não lácteos contendo probióticos.

Os fermentados são as principais matrizes alimentares não lácteas estudadas, pois o processo de fermentação proporciona uma maior viabilidade da cultura probiótica. Por outro lado, a incorporação de culturas probióticas em matrizes vegetais não fermentadas podem acarretar uma menor sobrevivência do micro-organismo (MIN et al., 2018).

As condições adversas no período de armazenamento e a passagem pelo trato gastrointestinal podem reduzir a viabilidade dos probióticos (RATHER et al., 2017). Assim, a microencapsulação tem sido citada como um método eficaz na proteção dos probióticos, permitindo que concentrações adequadas de células se mantenham viáveis durante o armazenamento e na passagem do sistema gastrointestinal, além de evitar que a cepa interaja com o alimento e altere negativamente a sua composição

e a sua aceitação sensorial (MIRANDA et al., 2019; RIBEIRO et al., 2014; ROLIM et al., 2020).

**Figura 1 - Produtos lácteos e não lácteos contendo probióticos**



Fonte: Lopes (2018).

### 2.3 TECNOLOGIA DE MICROENCAPSULAÇÃO

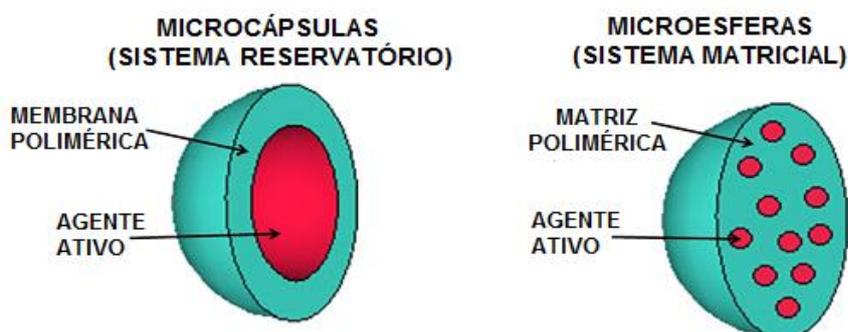
A encapsulação consiste em um conjunto de tecnologias que permite aprisionar uma substância dentro de outra substância com membranas impermeáveis ou semipermeáveis, globulares, delgadas e firmes com diâmetros que variam de nanômetros (nm) a milímetros (mm), no formato de cápsulas. O material encapsulado é nomeado de material do núcleo, agente ativo, enchimento, fase interna ou fase de carga útil (EI-SALAM; EI-SHIBINY, 2012; MOKHTARI et al., 2017). O processo de encapsulação aprisiona ou recobre com material encapsulante substâncias nos estados sólido, líquido ou gasoso, conservando a sua bioatividade (LI et al., 2017).

As principais tecnologias de encapsulação são a nanoencapsulação e a microencapsulação. A nanoencapsulação é uma tecnologia que produz partículas ou sistemas com dimensões inferiores a 1  $\mu\text{m}$  e é utilizada para encapsular compostos bioativos por diferentes tipos de veículos de tamanho nano, como nanoemulsão, lipossomas ou nanocápsulas (SANTOS et al., 2016). A microencapsulação é uma tecnologia que produz micropartículas com diâmetros na faixa de micrômetros (1 a 1000  $\mu\text{m}$ ) (CAMPOS et al., 2013). A microencapsulação foi apresentada pela primeira

vez com registro de patente por Green e Schleicher em 1950 para a produção de cápsulas contendo corante, que seriam incorporados em papeis para fazer cópias (PAULO; SANTOS, 2017).

As micropartículas podem ser classificadas em microesferas ou microcápsulas (Figura 2), embora os termos sejam frequentemente usados como sinônimos, as microesferas e microcápsulas são diferenciadas por sua estrutura interna e morfologia (PAULO; SANTOS, 2017). As microcápsulas possuem um sistema de reservatório, onde o agente ativo é envolvido por uma membrana polimérica, enquanto as microesferas possuem um sistema matricial onde o agente ativo é dissolvido molecularmente ou dispersado heterogeneamente em uma matriz polimérica (NORDSTIERNA et al., 2010).

**Figura 2 - Diferença entre microcápsulas e microesferas.**



Fonte: Paulo e Santos (2017).

A microencapsulação tem sido aplicada em diferentes setores da indústria, principalmente na indústria farmacêutica e de alimentos (PAULO; SANTOS, 2017). Na indústria alimentar são comumente utilizadas para o controle de liberação e o prolongamento da vida útil de agente ativo, para retardar reações oxidativas e mascarar aspectos sensoriais, mas tem sido pesquisada principalmente para microencapsular probióticos (ARSLAN-TONTUL; ERBAS, 2017).

A microencapsulação de probióticos tem o objetivo de proteger a célula microbiana de condições adversas (pH, oxigênio e luz), manter a viabilidade das cepas e oferecer maior funcionalidade por sua liberação controlada. Quando são adicionados em matriz alimentar, a microencapsulação evita alterações nas características sensoriais, como também oferece uma distribuição homogênea no produto (HOLKEM et al., 2016; MOKHTARI et al., 2017; RAJAM;

ANANDHARAMAKRISHNAN, 2015; TRIPATHI; GIRI, 2014). A eficiência da microencapsulação, a estabilidade durante o armazenamento e durante a passagem pelo trato gastrointestinal estão diretamente relacionadas à escolha do material microencapsulante e a técnica a ser utilizada (MOKHTARI et al., 2017; YING et al., 2016).

A indústria de alimentos para escolher a técnica de microencapsulação mais adequada para a diversidade de produtos alimentares existentes deve observar várias questões, como o que pode prejudicar a viabilidade dos probióticos, quais as condições do processamento e armazenamento dos alimentos, qual o tamanho e densidade da micropartícula ideal (para não causar sensação de areia na boca) e custo. Além disso, é necessário avaliar os mecanismos de liberação dos probióticos, que ocorre geralmente por mudança de pH, atividade de enzimas e agentes quelantes (MARTÍN et al., 2015; SARAQ; ARORA, 2017).

A escolha do material microencapsulante envolve principalmente o método de microencapsulação, custo, estabilidade no armazenamento, restrições legais e funcionalidade no alimento produzido (PARAMERA; KONTELES; KARATHANOS, 2011). Os polímeros aplicados em alimentos não podem ser citotóxicos e antimicrobianos, sendo os mais usados a carboximetilcelulose, goma xantana, amido, carragena, gelatina, pectina e principalmente alginato (HUQ et al., 2017; SHORI, 2017).

Diversas técnicas de microencapsulação têm sido estudadas como spray-drying, emulsificação, coacervação e gelificação iônica por extrusão (DE FARIAS et al 2019; DE PRISCO et al., 2015; FIORAMONTI; RUBIOLO; SANTIAGO, 2017; TIMILSENA et al., 2017; JANISZEWSKA-TURAK, 2017; VALERO-CASES; FRUTOS, 2015).

### **2.3.1 Técnica de gelificação iônica por extrusão**

A gelificação iônica por extrusão é um método de microencapsulamento que oferece como vantagens a praticidade e a fácil execução e pode ser usado para microencapsular compostos hidrofílicos, emulsionados ou hidrofóbicos (CARVALHO et al, 2019; CASTRO-ROSAS, et al., 2017). O processo de gelificação iônica se dá pela interação entre íons de baixa massa molecular de uma solução aquosa polimérica com polieletrólitos de cargas opostas, reagindo e formando um gel

insolúvel. As micropartículas de gel de hidrocoloides são usadas para microencapsulação de compostos bioativos ou controle de textura em produtos alimentícios, farmacêuticos, probióticos e cosméticos (KUROZAWA; HUBINGER, 2017).

A gelificação iônica pode ser do tipo externa ou interna. Em ambos os casos o  $\text{Ca}^{2+}$  é usado. Na gelificação iônica interna um sal de cálcio insolúvel, é disperso numa solução de polímero contendo o composto que será microencapsulado. Esta solução é extrudida ou emulsionada em óleo e o  $\text{Ca}^{2+}$  solúvel é liberado do complexo de cálcio após a redução do pH de 7,0 para 6,5 a fim de promover uma reticulação com o alginato (CARVALHO et al, 2019).

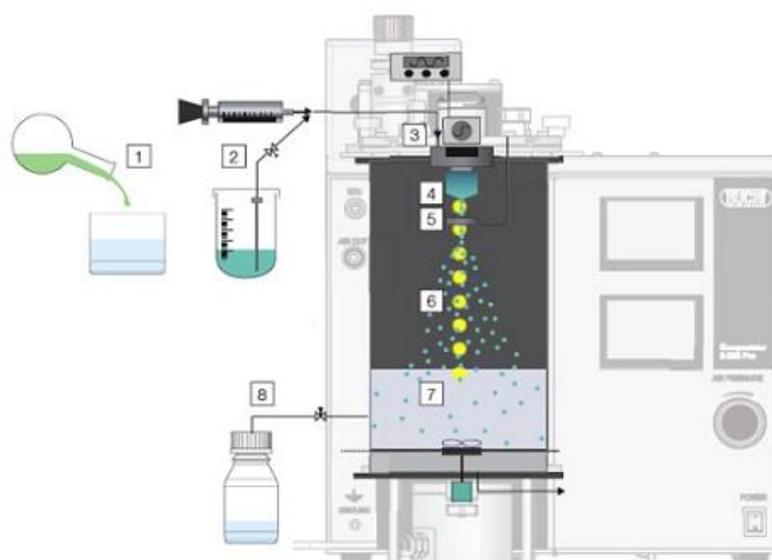
Na gelificação iônica externa, a solução do polímero em pH neutro se difundem de uma fonte externa para os íons  $\text{Ca}^{2+}$  (LUPO et al., 2015). A formulação envolve a elaboração de uma solução polimérica, acrescido do agente ativo e a extrusão da solução ocorre através de uma agulha de seringa ou bico, as gotículas caem em uma solução iônica, comumente o  $\text{CaCl}_2$ , solidificando instantaneamente e formando estruturas esféricas de gel, que contêm o agente ativo disperso em toda a matriz. (CARVALHO et al, 2019; HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2012; KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003; KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2004). Na Figura 3 estão ilustradas as etapas da produção de micropartículas através do encapsulador B-395 Pro (BUCHI, Suíça) pela técnica de gelificação iônica externa.

A microencapsulação por gelificação iônica externa utilizando polissacarídeos e íons de cálcio não requerem o uso de altas temperaturas ou solventes orgânicos tornando esta técnica viável e adequada para microencapsulamento de probióticos (MARTIN et al., 2015; RIBEIRO et al 2014). No geral, um dos materiais microencapsulantes mais utilizados para a produção de micropartícula por gelificação iônica é o alginato (CASTRO-ROSAS, et al., 2017; LIU et al., 2016; MOKHTARI et al., 2017).

Nesse caso, a solidificação ocorre através da interação entre as unidades do ácido gulurônico do alginato e os íons de cálcio da solução de cloreto de cálcio, assim concentrações elevadas formam um gel mais viscoso e micropartículas menores resultante das ligações cruzadas entre os íons de  $\text{Ca}^{2+}$  e os blocos do ácido gulurônico do polímero (SRIAMORNSAKA et al., 2008). Além da viscosidade da solução de alginato de sódio, o tamanho e a forma esférica da micropartícula também dependem

do diâmetro do orifício da extrusora, da distância entre o bico e a solução de cálcio, da velocidade do jato e da frequência da perturbação (DE PRISCO et al., 2015).

**Figura 3** - Ilustração da produção de micropartículas através do encapsulador B-395 Pro (BUCHI, Suíça) pela técnica de gelificação iônica externa. 1: Junção do agente ativo com o polímero; 2: Bombeamento da mistura com bomba de seringa; 3: Vibração aplicada; 4: Formação de gotículas; 5 e 6: Dispersão das gotículas; 7: Formação das micropartículas por gelificação; 8: Coleta das micropartículas.



Fonte: De Prisco et al. (2015).

## 2.3.2 Material microencapsulante

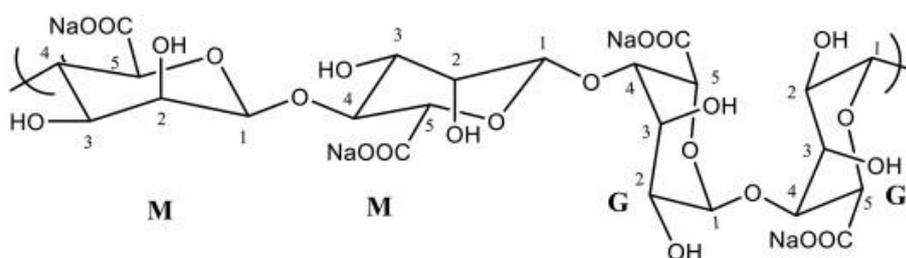
### 2.3.2.1 Alginato

O alginato é definido como um heteropolissacarídeo linear aniônico formado por resíduos do ácido D-manurônico e do ácido L-gulurônico (Figura 4). Encontrado em abundância na natureza, presente em algas marrons e bactérias, possui uma produção industrial de 30 mil toneladas anualmente. O alginato apresenta baixo custo, fácil manipulação e é classificado como seguro (GRAS), biocompatível e biodegradável (COOK et al., 2011; HUQ et al., 2017; MOKHTARI et al., 2017).

A capacidade do alginato de gelificar após ter contato com íons divalentes, como o cloreto de cálcio, faz com que uma associação de cadeia-cadeia que constitui o chamado “modelo de caixa de ovo” (Figura 5) entre quatro resíduos de L-gulurônico seja formada. Isto causa o aprisionamento de substâncias, essa característica torna o

alginato apropriado para a microencapsulação de bactérias (HUQ et al., 2017; RATHER et al., 2017; TRABELSI et al., 2013).

**Figura 4** - Estrutura química do alginato de sódio e seus dois componentes monoméricos: grupo manurônico (M) e grupo gulurônico (G).



Fonte: Huamani-Palomino et al. (2018).

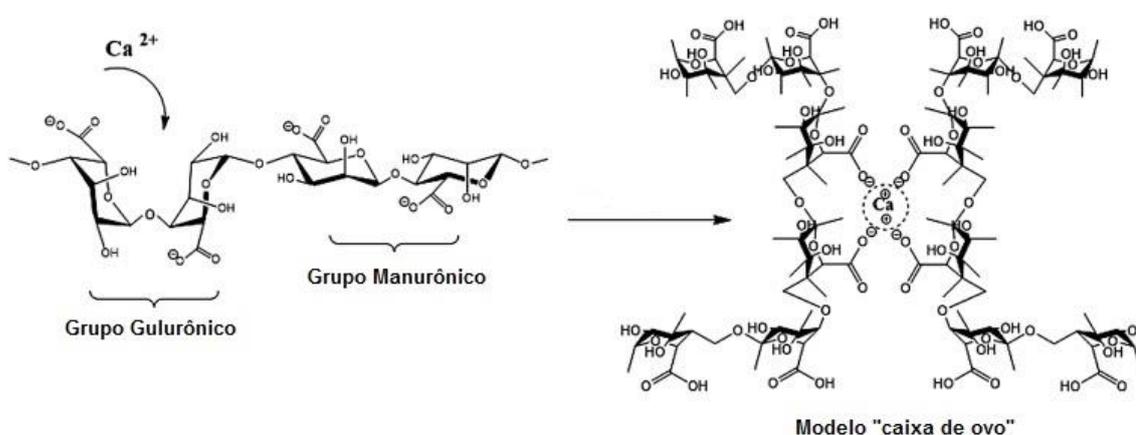
Células bacterianas medem de 1 a 3  $\mu\text{m}$  ficando bem armazenadas em micropartículas de alginato que apresentam poros com dimensões abaixo de 17 nm. Apesar do alginato de sódio ser adequado para microencapsulação, na presença de íons monovalentes, agentes quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  (fosfatos, lactatos e citratos), acidez elevada e ambientes químicos fortes tornam o alginato mais instável, o que pode afetar a liberação e a proteção do material microencapsulado (HUQ et al., 2017; MOKHTARI et al., 2017; RATHER et al., 2017). A baixa resistência mecânica ao trânsito gastrointestinal é um dos principais obstáculos na utilização de gel de alginato como material microencapsulante (WU et al., 2016).

A natureza porosa do alginato reticulado com cálcio permite que a umidade, o ambiente ácido e outros fluidos entrem pouco a pouco no gel. Isso diminui a capacidade de prevenir a ação de fatores ambientais adversos sobre as micropartículas (LIU et al., 2017; MARTÍN et al., 2015). A associação do alginato com outros microencapsulantes tem apresentado bons resultados de viabilidade e de maior controle sobre liberação bacteriana. Uma das formas de superar esse obstáculo e melhorar a estabilidade de micro-organismos microencapsulados com alginato é adicionar outros polímeros para revestimento das micropartículas (MARTÍN et al., 2015).

Técnicas combinadas de gelificação iônica e complexação com polieletrólitos catiônicos têm sido propostas com o objetivo de reduzir o processo de porosidade e difusão dos grânulos. A complexação é um resultado da interação eletrostática entre

as cargas aniônicas e as cargas catiônicas dos polímeros. Materiais como a quitosana podem fornecer maior proteção aos compostos microencapsulados, impedindo a difusão dos compostos hidrofílicos através dos poros da matriz de gel (CARVALHO et al., 2019).

**Figura 5** - Estrutura química do modelo caixa de ovo formado pela interação entre os íons carboxilato das unidades de guluronato do alginato de sódio e os íons  $\text{Ca}^{2+}$ .



Fonte: Agüero et al. (2017).

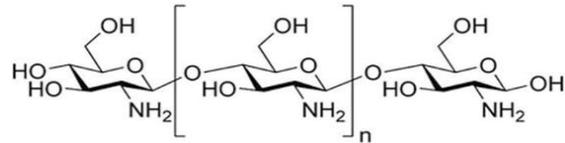
### 2.3.2.2 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo formado por unidades de 2-amino-2-desoxi-d-glicopirranose e 2-acetamido-2-desoxi-d-glicopirranose interconectadas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 (Figura 6). A quitosana é obtida principalmente a partir da hidrólise alcalina (desacetilação) da quitina de crustáceos, mas também pode ser extraída diretamente das paredes celulares de fungos da ordem Mucorales (BERGER et al., 2018; DE FARIAS et al., 2019). Quando solubilizada em solução ácida, a quitosana se apresenta como policação devido à protonação de grupos amino das unidades de 2-amino-2-desoxi-d-glicopirranose, o que resulta em grupos de amônia (FONSECA et al., 2019; SALAMA; HASANIN; HESEMANN, 2020).

A quitosana possui propriedades antioxidantes (NEGM et al., 2020), antifúngicas (QIN, LI, GUO, et al., 2020), antitumorais (ZOU et al., 2019) e anti-hipertensivas (NAVEED et al., 2019). Além disso, apresenta ampla aplicação em alimentos devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, mucoadesividade, atoxicidade e capacidade de formar biofilme principalmente para proteção em vegetais, contudo, devido a sua possível ação de inibição sobre os micro-organismos,

a quitosana tem sido mais utilizada como material de revestimento (GUERRA et al., 2015; MARTÍN et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2020).

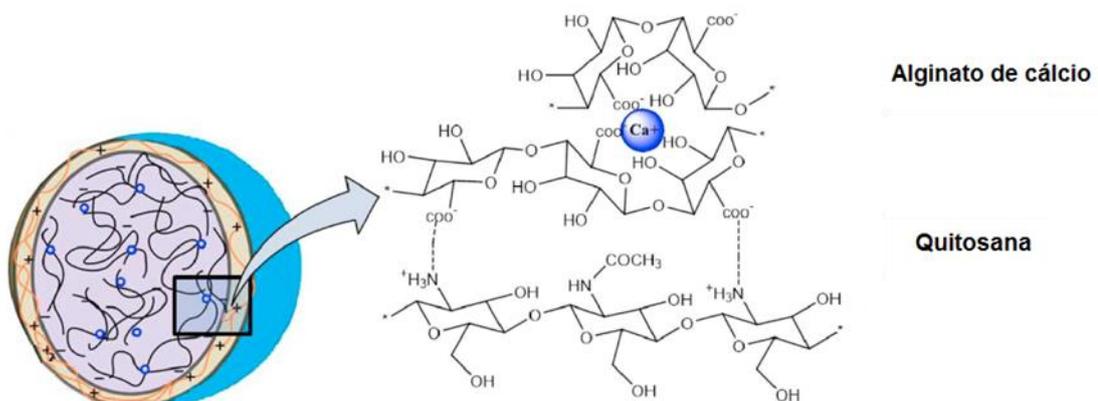
**Figura 6** - Estrutura química da quitosana.



Fonte: Yu et al. (2019).

Estudos mostram que as micropartículas de alginato revestidas com quitosana apresentam maior estabilidade das cápsulas ou superfície mais homogênea, que não é dissolvida na presença de agentes quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  e proporciona melhor proteção no trato gastrointestinal. O revestimento de quitosana diminui a porosidade das micropartículas de alginato, reduz o vazamento dos probióticos microencapsulados e mostra maior estabilidade a pH baixo (CHÁVARRI et al., 2010; DARJANI et al., 2016). A quitosana ajuda a melhorar a estabilidade e a rigidez do gel ligando-se ao grupo carboxilato ( $-\text{COO}^-$ ) do alginato através do seu grupo amina catiônica ( $-\text{NH}_3^+$ ) (DIMA et al., 2016). A Figura 7 ilustra a estrutura química formada pela interação eletrostática entre o alginato de cálcio e a quitosana.

**Figura 7** - Ilustração de micropartícula formada por matriz de alginato com revestimento de quitosana e a estrutura química correspondente a interação eletrostática entre o alginato de cálcio e a quitosana.



Fonte: Bedade, Sutar e Singhal (2019).

Estudos tem mostrado aumento da viabilidade de cepas probióticas em micropartículas de alginato de cálcio revestidas com quitosana, proporcionando maior proteção quando a célula é incorporada em matrizes alimentares (D'ORAZIO et al., 2015; ETCHEPARE et al., 2016; JANTARATHIN; BOROMPICHAICHARTKUL; SANGUANDEEKUL, 2017).

## 2.4 EXTRATOS HIDROSSOLÚVEIS VEGETAIS

Extratos hidrossolúveis são bebidas de origem vegetal que tem surgido como uma tendência na indústria de alimentos para substituir produtos lácteos (SILVA et al., 2020 a; RINCON; BOTELHO; DE ALENCAR, 2020). Apesar de possuírem uma aparência semelhante, os extratos possuem atributos físico-químicos, tecnológicos e sensoriais diferentes do leite (SHETI; TYAGI; ANURAG, 2016). Essas bebidas oferecem um bom aporte calórico, possuem quantidades significativas de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados, e são ricos em vitaminas e minerais (SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2020). Além disso, dependendo da matéria-prima utilizada, podem ser fontes de compostos bioativos e oferecer benefícios a saúde (SILVA et al., 2020 a).

Os extratos vegetais são produzidos através da extração da matéria-prima em água, seguida de homogeneização, aquecimento e filtração (MÄKINEN et al., 2015). Geralmente são produzidos a partir de leguminosas (soja e grão de bico), cereais (arroz e aveia) oleaginosas (amêndoa, castanha e avelã), sementes (gergelim e girassol) e pseudocereais (quinoa e amaranto) (RINCON; BOTELHO; DE ALENCAR, 2020).

A soja tem se destacado entre os extratos hidrossolúveis por ser uma importante fonte proteica, possuindo todos os aminoácidos essenciais e em adequadas proporções, sendo citado como o principal substituto não lácteo do leite (SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2020; FAO, 2018). Além disso essa leguminosa é rica em carboidratos, lipídeos, vitaminas e minerais. Contém em sua composição diversos fitoquímicos (isoflavonas, fitoesteróis, ácidos fenólicos e lectinas) que estão relacionadas com a prevenção de doenças crônicas, osteoporose e câncer (SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2020). Seu extrato foi produzido pela primeira vez na China há 2000 anos e seu consumo persiste atualmente por possuir baixo custo, ser refrescante e saudável (SHETI; TYAGI; ANURAG, 2016).

O arroz também é uma das principais matérias-primas usadas na produção de extratos hidrossolúveis por ser barato e de fácil acesso, estando presente habitualmente na alimentação da população mundial. Esse cereal é hipoalergênico e tem boa digestibilidade. Rico em nutrientes, possui um bom aporte calórico devido ao seu alto teor de amido, além de ser fonte de vitaminas (E e complexo B) e minerais (fósforo, magnésio e potássio). O perfil de aminoácidos do arroz é superior ao dos outros cereais, estando apenas a lisina ausente em sua composição (PANTOA et al., 2020; SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2020).

## 2.5 LEITE BOVINO E CAPRINO

Leite é definido como o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. De acordo com a legislação, o leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (BRASIL, 2017). O leite tem uma função fundamental na nutrição humana, sendo recomendado o seu consumo regular pela maioria das diretrizes alimentares no mundo como parte de uma dieta saudável devido a biodisponibilidade de seus nutrientes (SANCHES; PEIXOTO; CADORE, 2020).

O leite de vaca é considerado um alimento completo, possuindo em sua composição carboidratos, lipídeos, proteínas de alto valor biológico, vitaminas (A, E, B12, folato e riboflavina) e minerais (Ca, K, Mg, Na, P e Zn) (SANCHES; PEIXOTO; CADORE, 2020; SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2020). A caseína,  $\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina e albumina sérica são as principais proteínas encontradas no leite bovino (SANCHES; PEIXOTO; CADORE, 2020). Entre os minerais, o cálcio é o macroelemento mais abundante, sendo uma fonte importante para a saúde óssea, especialmente em crianças e adolescentes (VANGA; RAGHAVAN, 2018).

As estatísticas da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) em 2018 mostraram que o leite bovino é a maior variedade produzida no mundo com aproximadamente 550 milhões de toneladas métricas de leite. O leite de cabra ocupou o terceiro lugar com uma produção em torno de 15 milhões de toneladas métricas (FAOstat, 2018).

A produção de leite de cabra vem aumentando mais do que o dobro nas últimas décadas, com as tendências do mercado sugerindo que em 2030 crescerá em 53% (PULINA et al., 2018). No Brasil, o último censo agropecuário realizado mostrou que

o país possui um rebanho de caprinos de 8 milhões de cabeças e uma produção de 25 milhões de litros de leite. Em termos de participação regional, o Nordeste deteve 92,8% da criação desta espécie e 60,90% do leite produzido. O Estado da Bahia concentrou o maior rebanho com 28,8%, seguido pelos Estados de Piauí (22,4%), Pernambuco (17,2%) e Ceará (10,6%). Os maiores volumes de leite foram produzidos pelos estados da Paraíba (22,2%), Bahia (18,4%), Minas Gerais (16,1%) e Pernambuco (13,5%) (IBGE, 2017).

As cabras conseguem fornecer até 10% do seu peso em leite dando cerca de 400 L a 1500 L por período de lactação, o que as tornam hábeis produtoras (GRILLE et al., 2013). Esses fatores fizeram com que o comércio dos produtos derivados de leite caprino crescessem (MILORADOVIC et al., 2015). A Instrução Normativa nº 37 de 2000 define leite caprino como “o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de animais da espécie caprina sadios, bem alimentados e descansados” (BRASIL, 2000).

O leite de cabra se destaca em suas características físico-químicas e organolépticas, além de apresentar vários aspectos positivos à saúde como boa digestibilidade, alto valor nutricional e baixo potencial alergênico (DE MEDEIROS et al., 2014; PARK, 2007; SILVA et al., 2016). Os efeitos benéficos à saúde estão associados a diversos compostos bioativos presentes no leite caprino. Entre esses compostos estão os peptídeos, lipídios, hormônios, citocinas, oligossacarídeos e nucleotídeos, que podem ter um papel importante no desenvolvimento e manutenção de processos metabólicos, imunológicos e fisiológicos (VERRUCK; DANTAS; PRUDENCIO et al., 2019).

O leite de cabra apresenta glóbulos de gordura menores e seus ácidos graxos têm menor comprimento de cadeia quando comparados ao leite de vaca, isso melhora seu potencial digestivo (HODGKINSON et al., 2018). O leite caprino também exibe em sua composição química diferenças na estrutura das proteínas  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactalbumina e quantidades menores ou ausência da proteína  $\alpha$ s1-caseína, o que faz com que sejam menos alergênicos, tornando-os atrativos às pessoas que apresentam alergia ao leite de vaca (ALBENZIO; SANTILLO, 2011).

Os lipídeos são responsáveis pelas características organolépticas peculiares do leite de cabra e seus derivados, apresentando sabor e aroma mais forte do que os encontrados em outros tipos de leite (EL GALIOU et al., 2015; SANTURINO et al., 2017). O leite de pequenos ruminantes apresenta quantidades elevadas de ácidos

graxos de cadeia média e curta, quando comparados ao leite de vaca. Do total de lipídeos do leite de cabra, 13-20% são referentes a estes ácidos graxos (GÁMBARO et al., 2017) que são responsáveis pelo peculiar "gosto de cabra", principalmente os ácidos caprílico, cáprico e caproico (CLARK; GARCÍA, 2017).

O leite destes animais ainda contém ácido linoleico conjugado (CLA) que tem se destacado por apresentar benefícios à saúde como melhora do sistema imunológico, diminuição do peso corporal, além de possuir atividade anticancerígena, antioxidante e hipocolesterolêmica. O CLA é produto da bio-hidrogenação parcial dos lipídeos da ração que ocorre no rúmen, seu perfil depende da alimentação, do sistema de criação, raça, idade e da época do ano (VIEITEZ et al., 2016). Essas propriedades auxiliam no processamento e comercialização de produtos lácteos caprinos, como queijo (BEZERRA et al., 2017 a), iogurte (MACHADO et al., 2017) e leite fermentado (CHEN et al., 2018).

As demandas do mercado consumidor têm levado a indústria de laticínios a fornecer produtos que possuem componentes funcionais, como a adição de probióticos (VERRUCK; DANTAS; PRUDENCIO et al., 2019). O leite de cabra tem sido o principal veículo de probióticos entre os produtos lácteos não bovinos. Alguns estudos avaliaram a sobrevivência de probióticos em queijos caprinos do tipo coalho (BEZERRA et al., 2017 a; OLIVEIRA et al., 2014), ricota (MEIRA et al., 2015) e minas frescal (MOREIRA et al., 2019). Isso porque as suas propriedades físico-químicas, como pH adequado, boa capacidade de tamponamento e alto teor de nutrientes podem melhorar a sobrevivência desses micro-organismos (RANADHEERA; NAUMOVSKI; AJLOUNI, 2018).

## 2.6 PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DO QUEIJO RICOTA

O queijo pode ser encontrado de diversos tipos e formas e fabricado de diversas espécies de leite, consumido globalmente, é um dos derivados do leite mais degustado (FERNANDES et al., 2018). De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), queijo é definido como o “produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, enzimas específicas de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem

agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes” (BRASIL, 1996).

Os queijos são categorizados de acordo com a origem do leite, forma de coagulação, percentual de gordura, textura da pasta, perfil da casca e tempo de maturação (BRASIL, 1996). No processo de produção dos queijos os componentes hidrossolúveis que são as proteínas do soro, a lactose e minerais ficam retidos no soro, estes perfazem 50% das substâncias do leite (FOX et al., 2017).

A coagulação do leite é parte do processo de fabricação de queijos e o soro remanescente torna-se resíduo sendo considerado como desperdício pelos produtores. Milhões de toneladas de soro tem sido produzido por ano, essa grande quantidade deve-se a elevação de 2% na fabricação de queijos.

O soro do leite é rico em proteínas de elevado valor biológico, minerais e vitaminas, sendo considerado de alto valor nutricional pela indústria que tem buscado o desenvolvimento de novos produtos (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013; MEIRA et al., 2015; TRIBST et al., 2020). O soro de queijo contém 93-94% de água, 4,5-6,0% de lactose, 0,6-1,1% de proteínas, 0,8-1,0% de minerais, 0,05-0,9% de ácido láctico e 0,06-0,5% de gorduras, sua composição química depende do tipo de leite e do tipo de queijo produzido (PRAZERES et al., 2012). Entre os alimentos produzidos a partir do soro destaca-se a ricota (SALVATORE et al., 2014).

A ricota é um queijo tipicamente consumido na Itália e nos países ibero-americanos (BORBA et al., 2013). O nome ricota é derivado da palavra latina re-coctus, que significa recozida ou cozida duas vezes. Definida como um produto lácteo não curado, macio, branco, fresco, com um sabor suave e levemente adocicado, que é geralmente obtido por coagulação induzida pelo calor (85-90 °C) e acidez com precipitação das proteínas do soro de leite de vaca, ovelha, búfala ou cabra (BURITI et al., 2007; SAMEER et al., 2020; SATTIN et al., 2016).

De acordo com o regulamento técnico ricota é o queijo obtido pela precipitação a quente de proteínas do soro de leite, com ou sem adição de ácido, com adição de leite em até 20% (vinte por cento) do seu volume. A ricota fresca pode ser prensada ou não, salgada ou não, submetida à secagem ou não. Devendo apresentar aroma suave e característico, consistência mole, cor homogênea (branca a branco creme), sabor próprio, suave, salgado ou não e textura homogênea e granulosa (BRASIL, 2020). A ricota pode ser fresca, cremosa, maturada ou defumada (PIZZILO et al.,

2005). O creme pode ser obtido a partir da homogeneização da ricota com outros ingredientes (FRITZEN-FREIRE et al., 2013). Devido ao seu baixo teor de gordura e sal, alto teor proteico e fácil digestibilidade, a ricota pode corresponder às demandas dos consumidores e ao mercado de produtos leves e saudáveis (SATTIN et al., 2016). O baixo conteúdo de sal, alto valor de pH e elevada umidade podem torná-la adequada para carrear probióticos (SAMEER et al., 2020).

### 3 HIPÓTESE

1 - A microencapsulação de *L. acidophilus* La-05 em alginato com revestimento de quitosana permite a manutenção da viabilidade da cepa durante o armazenamento, após exposição a diferentes condições de estresse e ao trato gastrointestinal simulado.

2 - *L. acidophilus* La-05 em micropartículas de alginato com revestimento de quitosana adicionadas em matrizes lácteas e não lácteas mantem a viabilidade celular sem comprometer os aspectos sensoriais e de qualidade dos produtos.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* La-05 livre e microencapsulado em alginato e quitosana em bebidas lácteas e não lácteas e na incorporação em creme de ricota caprino, assim como, verificar as características de qualidade dos produtos.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir micropartículas de alginato com e sem o revestimento de quitosana contendo *L. acidophilus* La-05 e determinar a eficiência de encapsulação;
- Avaliar a viabilidade de *L. acidophilus* La-05 livres e em micropartículas durante armazenamento;
- Avaliar a viabilidade de *L. acidophilus* La-05 livres e em micropartículas liofilizadas após exposição a fatores de estresse ambiental (temperatura, pH e concentrações de NaCl);
- Produzir e caracterizar quanto aos aspectos de qualidade os extratos hidrossolúveis de soja e arroz, contendo células livres e micropartículas liofilizadas de *L. acidophilus* La-05;
- Avaliar a viabilidade de *L. acidophilus* La-05 livres e em micropartículas liofilizadas adicionadas em extratos hidrossolúveis de soja e arroz e em leites caprino e bovino, quando expostos ao trato gastrointestinal simulado;
- Produzir e caracterizar quanto aos aspectos físico-químicos, tecnológicos e sensoriais um creme de ricota caprino, contendo células livres e micropartículas liofilizadas de *L. acidophilus* La-05;
- Avaliar a viabilidade de *L. acidophilus* La-05 livres e em micropartículas liofilizadas adicionadas em um creme de ricota caprino, durante armazenamento e expostos ao trato gastrointestinal simulado.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 MICRO-ORGANISMO E OBTENÇÃO DO INÓCULO

A cultura de *Lactobacillus acidophilus* La-05 foi obtida na forma liofilizada da Chr. Hansen Brasil (Valinhos, São Paulo, Brasil). As culturas liofilizadas foram ativadas em 5 mL de caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (HiMedia, Mumbai, Índia) e incubadas a 37 °C por 24 h sob condições anaeróbicas (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid Ltda., Wade Road, UK). Posteriormente as culturas reativadas foram colhidas por centrifugação (4500 g, 15 min, 4 °C), o pellet foi lavado duas vezes em solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v) e as células foram ressuspensas em 5 mL do mesmo diluente para obter uma suspensão celular padrão.

A leitura em densidade óptica (DO) a 660 nm da suspensão das células foi de 1,8 que forneceu uma contagem de células viáveis de aproximadamente 9 log UFC/mL quando plaqueadas em ágar MRS. A suspensão celular foi submetida ao processo de microencapsulação ou usadas diretamente nos ensaios como células livres.

### 5.2 MICROENCAPSULAÇÃO DE *L. acidophilus* La-05 PELA TÉCNICA DE GELIFICAÇÃO IÔNICA EXTERNA

A microencapsulação de *L. acidophilus* La-05 foi realizada pela técnica de gelificação iônica externa por extrusão previamente descrita por De Prisco et al. (2015), com algumas modificações. O Encapsulador B-395 Pro foi equipado com uma bomba de seringa e um bico de 300 µm (BÜCHI Labortechnik, Flawil, Suíça) (Figura 8). A suspensão celular de *L. acidophilus* La-05 foi incorporada em 50 mL de uma solução estéril (121 °C por 15 min) de alginato de sódio a 3% (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA).

A seringa utilizada no sistema de alimentação foi carregada com 10 mL da suspensão de alginato de sódio e *L. acidophilus* La-05 e colocada no Encapsulador. O Encapsulador foi ajustado para uma taxa de fluxo de 26 mL/min com turbo, uma frequência de vibração de 1740 Hz e uma tensão do eletrodo de 980 mV. As gotículas de alginato de sódio contendo as células bacterianas foram endurecidas em 500 mL de uma solução de 0,5 mol/L de CaCl<sub>2</sub> e cuidadosamente agitada por 40 min,

posteriormente as micropartículas permaneceram 30 min em repouso para sedimentação. As micropartículas contendo *L. acidophilus* La-05 foram lavadas, filtradas com uma peneira e mantidas em água destilada estéril a 7 °C para os demais experimentos.

**Figura 8** - Produção de micropartículas de alginato através do encapsulador B-395 Pro pela técnica de gelificação iônica externa.



Fonte: Lopes (2018).

### 5.3 REVESTIMENTO DAS MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO COM QUITOSANA

As micropartículas de alginato (MA) foram revestidas com duas concentrações de quitosana (0,5 e 0,7%) de baixo peso molecular (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). A quitosana foi dissolvida em uma solução de ácido láctico (0,8%) sob agitação durante 20 min a 120 rpm, e seu pH foi ajustado para 5,7 - 6,0 usando NaOH 1 mol/L, posteriormente a solução de quitosana foi esterilizada (121 °C durante 15 min). As micropartículas de alginato foram adicionadas na proporção de 1 g para 10 mL de solução de quitosana e suavemente agitadas (100 rpm) durante 15 min. Posteriormente, as micropartículas de alginato revestidas de quitosana a 0,5% (MAQ5) e a 0,7% (MAQ7) foram filtradas com uma peneira, lavadas com água destilada estéril e armazenadas a 7 °C. Após teste preliminar que avaliou a eficiência de encapsulação da MAQ5 e MAQ7, apenas a concentração de 0,5% foi escolhida para ser utilizada nos demais experimentos.

#### 5.4 LIOFILIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE *L. acidophilus* La-05

As MA e MAQ5 (1 g), e as células livres (1 mL) de *L. acidophilus* La-05 foram colocados em criotubos contendo 10 mL de uma solução do crioprotetor Skimmed Milk estéril (Acumedia, EUA) na concentração de 10%. As amostras foram congeladas no mesmo dia em que foram produzidas a -80 °C por 24 h. Os criotubos foram submetidos ao processo de liofilização (modelo L-101, Liotop, São Carlos, Brazil) e retirados 48 h depois. As MA e MAQ5 liofilizadas foram referidas como MAL e MAQL, respectivamente. As amostras de MAL e MAQL foram embaladas a vácuo e armazenadas para experimentos posteriores.

#### 5.5 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

A morfologia das micropartículas foi avaliada por microscopia óptica utilizando um microscópio Zeiss Axio (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Alemanha) acoplado a uma câmera digital Axio-Cam HRc com ampliação de 25x. A microestrutura das micropartículas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isso, as micropartículas foram depositadas sobre uma fita adesiva comercial com revestimento duplo e fixadas a um *stub*. Em seguida, elas foram revestidas com ouro em um Sputter Coater (SCD 050, Bal-Tec, Wetzlar, Alemanha). Antes da secagem em ponto crítico, as amostras foram transferidas para cápsulas microporosas. As amostras foram visualizadas com um MEV (Quanta 250, Thermo Fisher Scientific-FEI, Waltham, MA, EUA) a uma tensão de aceleração de 15 kV.

A distribuição do tamanho das micropartículas (MA, MAQ5, MAL e MAQL) foram determinadas em água destilada pelo analisador de partículas Microtrac S3500 (Microtrac Inc., United States) e os resultados foram expressos em diâmetro médio de volume ( $\mu\text{m}$ ). A distribuição dos tamanhos das micropartículas foi calculada utilizando o fator de expansão, conforme fórmula proposta por Cai et al. (2014):

$$\text{Fator de expansão} = [(d_v, 90) - (d_v, 10)] / (d_v, 50).$$

Onde  $D(d_v, 90)$ ,  $D(d_v, 50)$  e  $D(d_v, 10)$  são os diâmetros do volume cumulativo em 90%, 50% e 10%. Este resultado fornece uma indicação direta da variação de tamanho das micropartículas em relação ao diâmetro de volume médio.

## 5.6 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE *L. acidophilus* La-05

A eficiência de encapsulação foi realizada conforme proposto por Chávarri et al. (2010), com pequenas modificações. Onde, 0,1 g de micropartículas probióticas (MA, MAQ5, MAQ7, MAL e MAQL), separadamente, foram adicionadas em 1 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v) e agitadas com solução de citrato de sódio (1%) em vórtex por 10 min para quebra das micropartículas. Em seguida, as amostras foram submetidas à diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) em solução salina estéril e posteriormente 20  $\mu$ L de cada diluição foi plaqueada em triplicata sobre ágar MRS pela técnica de inoculação por microgotas (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001). As placas foram incubadas por 48 h a 37 °C em anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) e submetidas à contagem do número de colônias formadas. Os resultados foram expressos em log UFC/mL. Esta metodologia foi utilizada para todas as análises subsequentes de viabilidade de *L. acidophilus* La-05.

A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada como segue:

$$EE = (N/N_0) \times 100.$$

Onde, N é o número de células aprisionadas e libertadas das micropartículas, e  $N_0$  é o número de células adicionadas à solução de alginato de sódio durante a produção das micropartículas. A concentração de quitosana que apresentou a maior EE foi usada em todos os outros experimentos.

## 5.7 VIABILIDADE DE *L. acidophilus* La-05 MICROENCAPSULADO DURANTE ARMAZENAMENTO

A avaliação da viabilidade de *L. acidophilus* La-05 livres e em micropartículas úmidas e liofilizadas foram realizadas de acordo com Halim et al. (2017). As células livres, e em MA e MAQ5 foram armazenadas de forma individualizada em tubos falcon contendo água destilada a 7 °C e a viabilidade celular foi avaliada nos dias 0, 7, 14, 21 e 28. As amostras liofilizadas de células livres, MAL e MAQL também foram armazenadas separadamente em criotubos a 7 °C e a viabilidade celular foi avaliada nos dias 0, 7, 15, 30, 60, 90 e 120.

Para determinar a contagem de células viáveis, 0,1 mL das células livres em água destilada; e 0,1 g das MA, MAQ5, MAL, MAQL e célula livre liofilizada foram adicionadas em 1 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v). As micropartículas

foram agitadas em vórtex com solução de citrato de sódio (1%) por 10 min para quebra das micropartículas. As amostras foram submetidas à diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) em solução salina estéril e a contagem de células viáveis foi realizada de acordo com metodologia descrita anteriormente pela técnica de inoculação por microgotas (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001). Os resultados foram expressos em log UFC/mL.

## 5.8 VIABILIDADE DE *L. acidophilus* La-05 MICROENCAPSULADO SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE

### 5.8.1 Viabilidade de *L. acidophilus* La-05 microencapsulado durante exposição ao estresse térmico

O tratamento térmico foi realizado conforme proposto por Alves et al. (2015). Onde, 0,1 g das amostras de células livres liofilizadas, MAL e MAQL de *L. acidophilus* La-05 foram separadamente adicionadas em 1 mL de água destilada estéril e expostas as temperaturas de 72, 85, e 90 °C por 30 s em banho maria e imediatamente resfriadas por imersão em gelo durante 10 min. As micropartículas foram agitadas em vórtex com solução de citrato de sódio (1%) por 10 min para quebra das micropartículas. As amostras foram submetidas à diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) em solução salina estéril e a contagem de células viáveis foi realizada de acordo com metodologia descrita anteriormente pela técnica de inoculação por microgotas (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001). Os resultados foram expressos em log UFC/mL.

### 5.8.2 Viabilidade de *L. acidophilus* La-05 microencapsulado durante exposição a diferentes concentrações de NaCl

Os testes de tolerância à salinidade foram realizados conforme sugerido por Sabikhi et al. (2010). Onde, 0,1 g das amostras liofilizadas de células livres, MAL e MAQL de *L. acidophilus* La-05 foram adicionadas, de forma separada, em 1 mL de diferentes concentrações de solução salina estéril (1,0; 1,5; e 2,0%). Subsequentemente foram incubados a 37 °C por 1, 2 e 3 h. As micropartículas foram agitadas em vórtex com solução de citrato de sódio (1%) por 10 min para quebra das

micropartículas. As amostras foram submetidas à diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) em solução salina estéril e a contagem de células viáveis foi realizada de acordo com metodologia descrita anteriormente pela técnica de inoculação por microgotas (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001). Os resultados foram expressos em log UFC/mL.

### **5.8.3 Viabilidade de *L. acidophilus* La-05 microencapsulado durante exposição a diferentes valores de pH**

O efeito do pH na viabilidade de *L. acidophilus* La-05 livre e microencapsulado foi avaliado de acordo com metodologia proposta por Castro-Cislaghi et al. (2012), com algumas modificações. Onde, 0,1 g das amostras de células livres liofilizadas, MAL e MAQL de *L. acidophilus* La-05 foram individualmente adicionadas em 1 mL de água destilada estéril e expostas a diferentes valores de pH (2, 4, e 6) previamente ajustados com HCl 5 mol/L ou com NaOH 1 mol/L. As amostras foram incubadas a 37 °C por 1, 2 e 3 h. As micropartículas foram agitadas em vórtex com solução de citrato de sódio (1%) por 10 min para quebra das micropartículas. As amostras foram submetidas à diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) em solução salina estéril e a contagem de células viáveis foi realizada de acordo com metodologia descrita anteriormente pela técnica de inoculação por microgotas (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001). Os resultados foram expressos em log UFC/mL.

## **5.9 OBTENÇÃO DOS LEITES CAPRINO E BOVINO E DOS EXTRATOS HIDROSSOLÚVEIS DE ARROZ E SOJA ADICIONADOS DE *L. acidophilus* La-05 MICROENCAPSULADO**

Os leites caprino e bovino foram adquiridos de forma comercial da Fazenda Pendências Carminha na cidade de Juazeirinho, Paraíba. O leite bovino foi obtido da raça Girolando e o leite caprino das raças Alpine, Toggenburg e Saanen, ambos submetidos a pasteurização a 65 °C por 30 min. A soja e o arroz foram adquiridos no comércio local da cidade de João Pessoa, Paraíba. Os extratos hidrossolúveis de soja e arroz foram produzidos conforme metodologia de He, Guo e Zhu (2019), com algumas modificações. Resumidamente, 100 g de grãos foram deixados de molho em 200 mL de água por 12h à 7 °C. Posteriormente a água do molho foi descartada e os

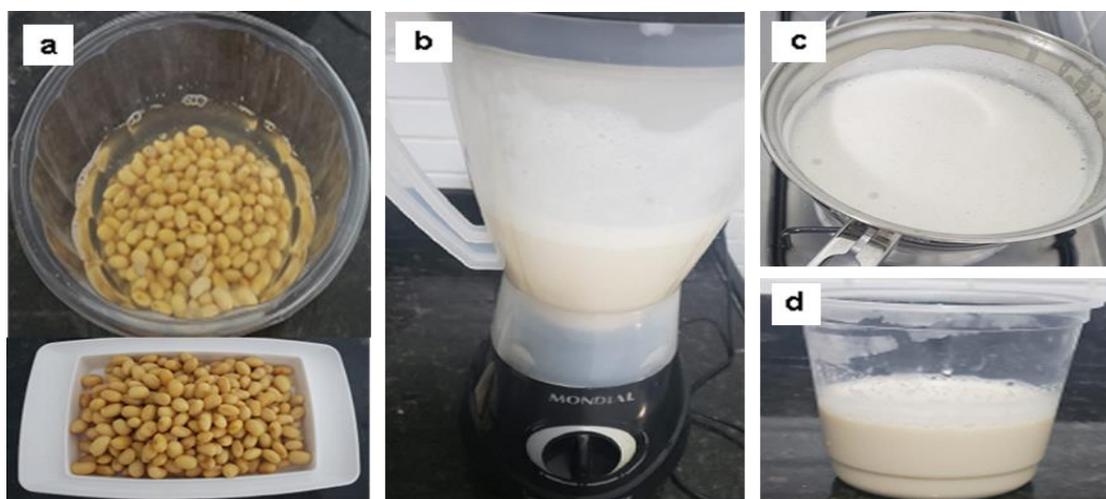
grãos foram adicionados em um liquidificador doméstico contendo 600 mL de água para serem triturados. Após aquecimento à 90 °C por 25 min, os extratos hidrossolúveis foram filtrados com uma peneira de aço inoxidável com malha de 120 (Figura 9 e 10). Células livres liofilizadas, MAL e MAQL (2,5 g) foram incorporadas separadamente em frascos de vidro estéril (50 mL) contendo 25 mL dos extratos hidrossolúveis vegetais (soja e arroz) e dos leites caprino e bovino pasteurizados.

**Figura 9** - Processamento do extrato hidrossolúvel de arroz: a) molho do grão de arroz; b) trituração do grão de arroz; c) aquecimento do extrato hidrossolúvel de arroz; d) extrato hidrossolúvel de arroz preparado.



Fonte: Lopes (2020).

**Figura 10** - Processamento do extrato hidrossolúvel de soja: a) molho do grão de soja; b) trituração do grão de soja; c) aquecimento do extrato hidrossolúvel de soja; d) extrato hidrossolúvel de soja preparado.



Fonte: Lopes (2020).

## 5.10 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS EXTRATOS HIDROSSOLÚVEIS DE ARROZ E SOJA E VIABILIDADE DE *L. acidophilus* La-05 MICROENCAPSULADO DURANTE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO

A viabilidade de *L. acidophilus* La-05 livre e em micropartículas liofilizadas (MAL e MAQL) incorporadas nos extratos hidrossolúveis de arroz e soja foram avaliadas nos dias 0, 3 e 7 de armazenamento refrigerado (7 °C). Os extratos hidrossolúveis contendo a cepa probiótica microencapsulada foram agitados em vórtex com solução de citrato de sódio (1%) por 10 min para quebra das micropartículas. Para determinar a contagem de células viáveis, 0,1 mL dos extratos hidrossolúveis foram adicionados em 1 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v). As amostras foram submetidas à diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) em solução salina estéril e a contagem de células viáveis foi realizada de acordo com metodologia descrita anteriormente pela técnica de inoculação por microgotas (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001). Os resultados foram expressos em log UFC/mL.

A avaliação físico-química dos extratos hidrossolúveis de arroz e soja adicionados de *L. acidophilus* La-05 livre e em micropartículas liofilizadas (MAL e MAQL) ocorreu nos dias 0 e 7 de armazenamento refrigerado (7 °C) (AOAC, 2005). Os valores de pH dos extratos hidrossolúveis foram determinados utilizando um potenciômetro digital (MS Tecnopon Instrumentação, mPA210, Piracicaba, Brasil). O conteúdo de sólidos solúveis totais foram determinados em um refratômetro digital (Instruterm®, São Paulo, Brasil) e expressos como °Brix. A determinação da cor instrumental foi realizada através de um colorímetro (Minolta®, modelo CR400, Osaka, Japão) utilizando o sistema CIEL\*a\*b\* (CIE, 2004). O equipamento forneceu os parâmetros L\* (luminosidade), a\* (componente vermelho (+) – verde (-)) e b\* (componente amarelo (+) – azul (-)).

## 5.11 VIABILIDADE DE *L. acidophilus* La-05 MICROENCAPSULADO INCORPORADO EM EXTRATOS HIDROSSOLÚVEIS VEGETAIS, LEITES CAPRINO E BOVINO EXPOSTOS AO TRATO GASTROINTESTINAL SIMULADO

A viabilidade de *L. acidophilus* La-05 em sua forma livre e em micropartículas liofilizadas adicionadas em extratos hidrossolúveis de soja e arroz e em leites caprino e bovino foram avaliadas durante simulação do trato gastrointestinal (TGI) após 7 dias

de armazenamento refrigerado (7 °C) (MADUREIRA et al., 2011). Água destilada inoculada com *L. acidophilus* La-05 foi usada como amostra controle. O experimento ocorreu de forma contínua simulando o processo de digestão no esôfago-estômago, duodeno e íleo. O volume inicial de 25 mL das amostras aumentou gradualmente ao passo que as soluções correspondentes a cada etapa da digestão foram colocadas no sistema. As enzimas e os sais biliares (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) foram esterilizados com filtro de membrana de 0,22 µm (Millipore, Billerica, MA, EUA) no momento do experimento e conservados em banho de gelo durante a realização da simulação.

Na simulação da passagem pelo esôfago-estômago foi adicionado uma solução de pepsina (25 mg/mL diluído em HCl 0,1 mol/L) a uma taxa de 0,05 mL/mL em 90 min. Nesta etapa, o pH foi reduzido gradualmente utilizando solução de HCl a 1 mol/L. O duodeno foi simulado adicionando solução de pancreatina (1 g/L diluído em NaHCO<sub>3</sub> a 0,1 mol/L) e sais biliares (6 g/L diluído em NaHCO<sub>3</sub> a 0,1 mol/L) ao sistema em uma proporção de 0,25 mL/mL e ajustando o pH para 5,0 com NaHCO<sub>3</sub> a 0,1 mol/L. O íleo foi simulado com o ajuste do pH para 6,5 com solução de NaHCO<sub>3</sub> a 0,1 mol/L. A agitação mecânica (simulação do peristaltismo intestinal) e a temperatura de 37 °C (simulação da temperatura corporal) foram realizadas em uma incubadora (TE-424 TECNAL, Orbital Shaker Incubadora, São Paulo, SP, Brasil).

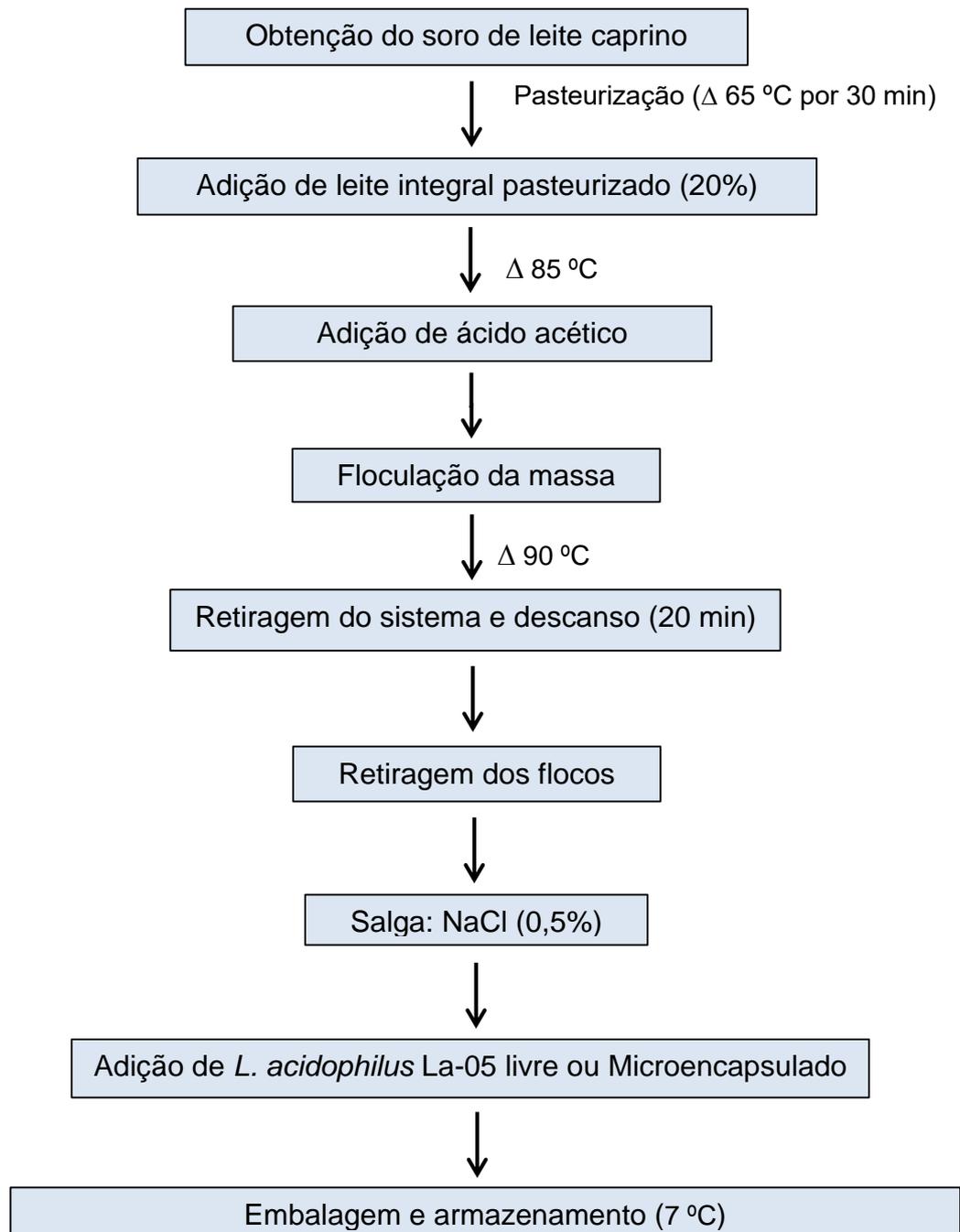
Os extratos hidrossolúveis foram retirados do sistema após o término de cada etapa da simulação. As amostras contendo a cepa probiótica microencapsulada foram agitadas em vórtex com solução de citrato de sódio (1%) por 10 min para quebra das micropartículas. Para determinar a contagem de células viáveis, 0,1 mL dos extratos hidrossolúveis foram adicionados em 1 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v). As amostras foram submetidas à diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) em solução salina estéril e a contagem de células viáveis foi realizada de acordo com metodologia descrita anteriormente pela técnica de inoculação por microgotas (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001). Os resultados foram expressos em log UFC/mL.

## 5.12 FABRICAÇÃO DO CREME DE RICOTA CAPRINO

O soro caprino foi obtido através da produção de queijo coalho, que é típico da região nordeste do Brasil. A produção do coalho foi realizada através de coagulação

enzimática, de acordo com metodologia de Garcia et al. (2012). A Figura 11 ilustra o fluxograma de produção do creme de ricota caprino.

**Figura 11.** Fluxograma de produção do creme de ricota caprino adicionado de probiótico microencapsulado.



Fonte: Lopes (2018).

O creme de ricota foi elaborada conforme proposto por Barbosa et al. (2016), usando uma proporção de 20% de leite caprino integral para 80% de soro de leite caprino. Após o soro ser aquecido a 65 °C, o leite foi incorporado na preparação e a temperatura foi elevada para 85 °C. Em seguida, o ácido acético (0,67%) foi adicionado para obter o precipitado proteico. Quando a temperatura atingiu 90 °C, a preparação foi removida do aquecimento e deixada em repouso por 20 min. Após o período de descanso, os flocos foram removidos, homogeneizados e salgados com NaCl (0,5%) (Figura 12).

Posteriormente, foram adicionados 1 g de células livres liofilizadas, MAL ou MAQL para cada 10 g de ricota. O creme de ricota foi embalado em sacos de polipropileno e armazenado a 7 °C por 7 dias concordando com as orientações técnicas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) que sugere que este produto seja comercializado em até 7 dias de armazenamento sob refrigeração (EGITO et al., 2007).

Foram formulados quatro tipos de creme de ricota caprino: creme de ricota adicionado de *L. acidophilus* La-05 em MAL, creme de ricota caprino adicionado de *L. acidophilus* La-05 em MAQL, creme de ricota caprino adicionado de células livres liofilizadas de *L. acidophilus* La-05 e creme de ricota caprino sem adição de micro-organismo. Cada tipo de creme de ricota produzido será avaliado separadamente. As amostras foram processadas em triplicata e em dois experimentos diferentes. Para cada teste, as amostras foram formuladas a partir do mesmo lote de soro de leite e leite.

**Figura 12** - Processamento do creme de ricota caprino: a) soro de leite caprino em aquecimento; b) Flocculação da massa; c) Creme de ricota caprino preparado.



Fonte: Lopes (2019).

### **5.12.1 Análises microbiológicas e viabilidade de *L. acidophilus* La-05 microencapsulado durante armazenamento refrigerado**

Os cremes de ricota de cabra foram submetidos às análises microbiológicas preconizadas pela legislação vigente RDC N° 12, de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) destinadas aos queijos de muito alta umidade que fazem parte do grupo de alimentos n° 8 (leite de bovinos e de outros mamíferos e derivados). Vinte e cinco gramas de amostras foram submetidas às análises de coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positivo, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, de acordo com metodologias da American Public Health Association (APHA, 2001).

As amostras de creme de ricota caprino com *L. acidophilus* La-05 livres e em micropartículas liofilizadas foram armazenados a 7 °C e a viabilidade celular foi avaliada nos dias 0 e 7 de armazenamento. Para determinar a contagem de células viáveis, 0,1 g do creme de ricota foi adicionado em 1 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v). O creme de ricota que continha as micropartículas foram agitados em vórtex em solução de citrato de sódio (1%) por 10 min para quebra das micropartículas. As amostras foram submetidas à diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) em solução salina estéril e a contagem de células viáveis foi realizada de acordo com metodologia descrita anteriormente pela técnica de inoculação por microgotas (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001). Os resultados foram expressos em log UFC/mL.

### **5.12.2 Viabilidade de *L. acidophilus* La-05 microencapsulado incorporado em creme de ricota caprino exposto ao trato gastrointestinal simulado**

A viabilidade de *L. acidophilus* La-05 em sua forma livre e em micropartículas liofilizadas incorporadas no creme de ricota caprino foram avaliados durante simulação do trato gastrointestinal no 7º dia de armazenamento refrigerado (7 °C) (MADUREIRA et al., 2011). Para isso, 25 g do creme de ricota caprino foi adicionado em frasco estéril (50 mL). O experimento foi realizado de acordo com metodologia descrita no tópico 5.11. As amostras de creme de ricota caprino foram retiradas do sistema após o término de cada etapa da simulação.

As amostras contendo a cepa probiótica microencapsulada foram agitadas em

vórtex com solução de citrato de sódio (1%) por 10 min para quebra das micropartículas. Para determinar a contagem de células viáveis, 0,1 mL das amostras foram adicionados em 1 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v). Posteriormente foram submetidas à diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) em solução salina estéril e a contagem de células viáveis foi realizada de acordo com metodologia descrita anteriormente pela técnica de inoculação por microgotas (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001). Os resultados foram expressos em log UFC/mL.

### **5.12.3 Avaliação do rendimento e sinerese do creme de ricota caprino**

O rendimento das amostras do creme de ricota caprino foram calculados utilizando o peso do creme de ricota obtido no final do processamento para cada litro da mistura de leite e soro do leite de cabra empregados na produção do creme de ricota (g de creme de ricota/L de leite e soro de leite) (BORBA et al., 2013). A sinerese foi calculada como o peso de soro liberado por cada grama de ricota em sua própria embalagem após o período de armazenamento (dia 1 e 7) dividido pelo peso do queijo em gramas da mesma embalagem e multiplicado por 100 (BORBA et al., 2013).

### **5.12.4 Análises de pH, acidez, atividade de água e composição centesimal do creme de ricota caprino**

As amostras do creme de ricota caprino foram submetidas aos ensaios para determinação de: pH, acidez em ácido láctico, umidade, proteínas, cinzas, lipídeos e atividade de água (Aa) (AOAC, 2005) no 1º e 7º dia de armazenamento refrigerado (7 °C). O pH das amostras foi aferido com um pHmetro modelo 021/15 (Quimis, São Paulo, Brasil). A acidez em ácido láctico foi determinada por titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 N (920.124). A umidade foi determinada por secagem a 105 °C até peso constante (925.09). Cinzas por incineração em mufla a 550 °C (930.30). O teor de proteínas pelo método de Kjeldahl (939.02) e os lipídeos pelo método de Gerber, conforme metodologia adaptada para queijos (2000.18). A atividade de água foi determinada através do equipamento Aqua Lab modelo CX-2 (Aqualab, Pullman, EUA) (978.18).

### **5.12.5 Análise de proteólise do creme de ricota caprino**

A proteólise foi avaliada no 1º e 7º dia de armazenamento refrigerado (7 °C) através do índice de proteólise em extensão (IPE) e do índice de proteólise em profundidade (IPP), utilizando as equações:  $IPE = (NS \text{ a pH } 4,6) / NT \text{ (nitrogênio total)} \times 100$ ; e  $IPP = (NS \text{ em TCA}) / NT \times 100$  (BEZERRA et al., 2016). As determinações dos teores de nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel (NS) em ácido tricloroacético (TCA) e nitrogênio solúvel (NS) em pH 4,6 foram realizadas pelo método de Kjeldahl, seguindo a metodologia da AOAC (2005) (939.02).

#### **5.12.6 Análise de textura e cor instrumental do creme de ricota caprino**

A análise de textura (dureza, elasticidade, adesividade, gomosidade e coesividade) do creme de ricota caprino foi realizado de acordo com Barbosa et al. (2016) no 1º e 7º dia de armazenamento refrigerado (7 °C), através de teste de dupla compressão utilizando um texturômetro TA-XT2® (Stable Micro Systems, Haslemere, Reino Unido) e dispositivo cilíndrico de acrílico com 25 mm de diâmetro, compressão de 1 cm e velocidade de 1 mm/s. As amostras foram colocadas em recipiente cilíndrico de inox com altura de 2 cm e diâmetro de 5 cm. O software Texture Expert for Windows® – versão 1.20 (Stable Micro Systems) foi utilizado para análise dos dados.

A cor instrumental foi determinada através de colorímetro CR-300 (Minolta Co., Osaka, Japão), utilizando o sistema CIEL\*a\*b\* (CIE, 2004). O equipamento forneceu os parâmetros L\* (luminosidade), a\* (componente vermelho (+) – verde (-)) e b\* (componente amarelo (+) – azul (-)).

#### **5.12.7 Análise do perfil de açúcares e ácidos orgânicos do creme de ricota caprino**

Um extrato solúvel das amostras de creme de ricota caprino foram preparados para determinar o perfil de açúcares e ácidos orgânicos (ZEPPA, CONTERNO, GERBI, 2001) no 1º e 7º dia de armazenamento refrigerado (7 °C). As amostras (2g) foram homogeneizadas com um aparelho Ultra Turrax (IKA, Staufen, Germany) por 10 min em 10 mL de água ultra pura. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (4000 g, 15 min, 4 °C) e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro qualitativo e em filtro de membrana de 0,45 mm.

O perfil de açúcar foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (VARIAN Waters 2690, Califórnia, USA), usando um sistema isocrático de solvente, válvula "Rheodyne" com alça de 20 $\mu$ L; acoplado com uma coluna Agilent Hi-Plex Ca (7,7 x 300mm, 8 $\mu$ ), a 85 °C e detector de índice de refração (VARIAN). Água ultrapura foi utilizada como fase móvel, a um fluxo de 0,6 mL/min e o tempo de duração da corrida foi de 30 min. A quantificação dos açúcares foi realizada com a injeção de uma curva padrão para cada açúcar detectado, para a obtenção da equação da reta. Os dados do perfil de açúcares foram processadas no software GALAXIE Chromatography Data System e a quantificação foi obtida por injeção da curva padrão e expressa em g/100g.

O perfil de ácidos orgânicos foi analisado em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Chromaster HPLC, Hitachi, Tóquio, Japão) com injeção automática e bomba quaternária. A detecção dos ácidos orgânicos foi realizada em coluna Phenomenex Luna C18 (4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m) a 40 °C, equipado com um detector de arranjo de diodo (Hitachi, Tokyo, Japan) com comprimentos de onda de 210 nm e solução de água e metanol (97,5:2,5) como fase móvel (fluxo de 0,5 mL/min por 15 min). Os dados do perfil de ácidos orgânicos foram processadas no software EZ Crom e a quantificação foi obtida por injeção da curva padrão e expressa em g/100g.

#### **5.12.8 Análise do perfil de ácidos graxos do creme de ricota caprino**

A metilação dos ácidos graxos presentes nos extratos lipídicos foi realizada seguindo a metodologia adaptada de Molquentin e Precht (2000) no 1<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dia de armazenamento refrigerado (7 °C). A extração foi realizada em 0,5 g de cada amostra de creme de ricota de cabra usando soluções de 2 mol/L de KOH e 1,25 mol/L de HCl diluídas em metanol. A detecção dos ésteres de ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa (Varian 430-GC, Califórnia, EUA), acoplada com detector de ionização de chama e a uma coluna capilar de sílica fundida (SP<sup>TM</sup>-2560, SUPELCO, Bellefonte, EUA), com dimensões de 100 m x 0,25 mm e 0,20  $\mu$ m de espessura do filme. O hélio foi utilizado como gás de arraste (vazão de 1 mL/min).

A temperatura inicial do forno foi de 40 °C sendo aumentada 10 °C/min até atingir 180 °C, permanecendo por 30 min, seguida de outro aumento de 10 °C /min até atingir 240 °C, o qual foi mantido por mais 10 min, totalizando 62 min. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 240 e 250 °C,

respectivamente. Alíquota do extrato esterificado (1,0 mL) foi injetada em um injetor Split/Splitless e os cromatogramas foram registrados em software Galaxie Chromatography Data System. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos das amostras com os padrões de um Kit Supelco ME19 (Boston, MA, EUA) (ésteres metílicos de ácidos graxos C6 - C24). Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos das amostras e expressos como g/100 g. Foram calculados os índices de: aterogenicidade (IA), trombosidade (IT), ácidos graxos desejáveis (DFA) e ácidos graxos saturados hipercolesterolêmico (HSFA) (SPERRY et al., 2018).

#### **5.12.9 Análise do perfil de voláteis do creme de ricota caprino**

Os compostos voláteis das amostras do creme de ricota de cabra foram extraídos de acordo com Bezerra et al. (2017 a) no 1º e 7º dia de armazenamento refrigerado (7 °C), utilizando a técnica de microextração em fase sólida (SPME). Uma fibra revestida com 65 µm de Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno (PDMS/DVB) (Supelco, Bellafonte, PA, EUA) foi usada para extração do headspace. Antes do uso, a fibra foi ativada de acordo com as condições do fabricante (250 °C/30 min). Vinte gramas de amostra foram colocadas em um frasco de vidro de 100 ml, com uma tampa rosqueável contendo um septo revestido de Teflon.

O sistema foi submetido ao aquecimento a 45 °C em banho-maria por 20 min. Após esse período, a fibra foi exposta ao headspace por 40 min a 45 °C. Em seguida, a fibra foi inserida no injetor de cromatografia em fase gasosa a 250 °C por 7 min no modo splitless. A separação dos compostos foi realizada utilizando um cromatógrafo a gás 7890B acoplado a um espectrômetro de massa da Agilent Technologies 5977B (Little Falls, DE, EUA) e uma coluna VF-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O espectrômetro de massa foi operado por impacto de elétrons, com uma energia de ionização de 70 eV e uma variação de scan de m/z 35 a m/z 350 a 3,33 scan/s.

A identificação dos compostos foi realizada através da análise dos padrões de fragmentação exibidos nos espectros de massa. A confirmação foi feita comparando seus espectros de massa com os presentes na base de dados fornecida pelo equipamento NIST (National Institute of Standards and Technology, EUA); bem como através dos seus índices de retenção com os de compostos conhecidos, através da

injeção de n-alcenos homólogos (C8-C20). A quantificação dos voláteis foi obtida pela normalização das áreas dos compostos e expressa em porcentagem da área (%).

#### **5.12.10 Análise sensorial**

A análise sensorial foi realizada após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco sob o número de CAEE 19328619.7.3001.5188 com parecer 3.666.836 (Anexo C). Somente foram submetidos a análise sensorial os queijos cujas análises microbiológicas indicaram o atendimento aos padrões recomendados pela legislação específica (BRASIL, 2001).

A avaliação sensorial foi realizada no 7º dia de fabricação do creme de ricota caprino por uma equipe de 100 provadores não treinados, consumidores habituais do produto, recrutados aleatoriamente uma única vez, constituídos tanto pelo gênero feminino como masculino, com idade acima de 18 anos, alfabetizados. Os provadores não apresentavam problema de saúde ou deficiência física que viesse a comprometer a avaliação sensorial dos produtos, especificamente relacionado a três dos sentidos humano: olfato, paladar e visão.

A avaliação sensorial das amostras foi realizada através de teste de aceitação do consumidor, intenção de compra e teste de preferência entre as amostras (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2007). O teste de aceitação do consumidor foi baseado na aparência, cor, textura, sabor, aroma e avaliação global do produto, utilizando-se escala hedônica estruturada de 9 pontos (Apêndice A). (1 = desgostei muitíssimo; 2 = desgostei muito; 3 = desgostei moderadamente; 4 = desgostei ligeiramente; 5 = nem gostei/nem desgostei; 6 = gostei ligeiramente; 7 = gostei moderadamente; 8 = gostei muito; 9 = gostei muitíssimo). Os cremes de ricota foram considerados aceitos quando obtiveram média  $\geq 5,0$  (equivalente ao termo hedônico “nem gostei/nem desgostei”). A intenção de compra também foi avaliada através de escala hedônica de 5 pontos (1 = jamais compraria; 2 = possivelmente não compraria; 3 = talvez comprasse/talvez não comprasse; 4 = possivelmente compraria; 5 = compraria) (Apêndice A). Para o teste de preferência os provadores foram convidados a escolher as amostras mais e menos apreciadas (Apêndice B).

Os participantes após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice C) analisaram as amostras de: creme de ricota caprino

sem adição de probióticos; creme de ricota caprino adicionado de *L. acidophilus* La-05 livre liofilizado; creme de ricota caprino adicionado de *L. acidophilus* La-05 em MAL; creme de ricota caprino adicionado de *L. acidophilus* La-05 em MAQL. As amostras foram apresentadas em recipientes descartáveis adequados, devidamente codificados com números aleatórios de 3 dígitos a uma temperatura na faixa de 7 a 10 °C. A avaliação foi procedida em cabines individuais, sob luz branca, acompanhados com água mineral em temperatura ambiente e bolacha tipo água e sal para remoção do sabor residual.

### 5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada utilizando o software Sigma Stat 3.5. (Jandel Scientific Software, San Jose, California). Os experimentos foram executados em triplicata, em dois momentos independentes (repetições) e os resultados expressos como uma média  $\pm$  desvio padrão dos ensaios. Os dados foram analisados para determinar diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) através da análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. O teste de Friedman foi utilizado para analisar o teste de classificação de preferências da análise sensorial.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados oriundos deste trabalho culminaram em dois artigos científicos. O primeiro artigo com o título “Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-05 and incorporation in vegan milks: Physicochemical characteristics and survival during storage, exposure to stress conditions, and simulated gastrointestinal digestion” foi publicado no periódico Food Research International. E o segundo artigo com o título “Spreadable goat Ricotta cheese added with *Lactobacillus acidophilus* La-05: Can microencapsulation improve the probiotic survival and the quality parameters?” está sendo submetido para periódicos de alto fator de impacto.

### 6.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

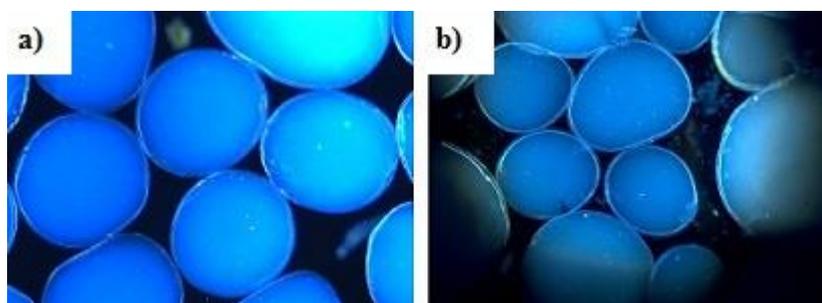
As imagens de microscopia óptica (Figura 13) mostram as micropartículas (MA e MAQ5) íntegras, esféricas e uniformes, bem como dispersas sem aglomeração. A partir das imagens da microscopia eletrônica de varredura, observou-se que as MAL eram ásperas com dobras e cavidades, apresentando uma estrutura porosa (Figura 14). O revestimento de quitosana na micropartícula de alginato (MAQL) resultou em uma estrutura menos porosa e mais estável. Isto se deve provavelmente as interações eletrostáticas entre o grupo carboxilato (-COO-) do alginato com o grupo amina catiônico (-NH<sup>3+</sup>) da quitosana (DARJANI et al., 2016; DIMA et al., 2016; JIANG et al., 2014; SHI; ALVES; MANO, 2008).

Assim, o revestimento de quitosana diminuiu a permeabilidade do alginato, fornecendo uma superfície uniforme e espessa, resultando em uma micropartícula mais compacta e mais densa (VAZIRI; ALEMZADEH; VOSSOUGH, 2018). Portanto, a quitosana foi capaz de cobrir as porosidades da cápsula de alginato, o que pode ter aumentado a proteção da cultura probiótica (Figura 14) (ANSARI et al., 2017).

O diâmetro de MA, MAQ5, MAL, MAQL foram de  $793,93 \pm 10,81$ ,  $891,43 \pm 50,92$ ,  $740,60 \pm 13,18$  e  $865,80 \pm 28,58$   $\mu\text{m}$ , respectivamente. O tamanho das partículas na faixa de micrômetros pode fornecer uma textura suave ao produto alimentar, enquanto as partículas em tamanho em milímetros podem fornecer uma textura arenosa (ZANJANI et al., 2012). Além disso, são necessárias partículas com tamanho superior a 100  $\mu\text{m}$  para oferecer proteção as células probióticas durante condições gastrointestinais simuladas (ZANJANI et al., 2014). A incorporação de

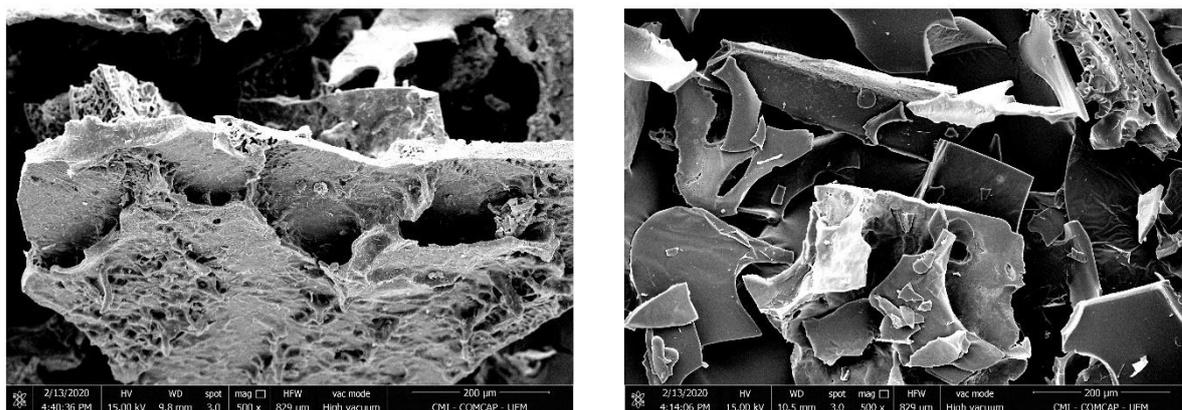
quitosana na micropartícula de alginato (MAQ5) resultou em um aumento no diâmetro médio das partículas ( $891,43 \pm 50,92 \mu\text{m}$ ) e no fator de expansão ( $1,04 \pm 0,01$ ) em comparação com a micropartícula de alginato sem o revestimento (MA,  $793,93 \pm 10,81 \mu\text{m}$  e  $0,97 \pm 0,08$ , respectivamente). Portanto, as micropartículas revestidas com quitosana apresentaram um diâmetro maior e menos uniforme. De fato, quando a quitosana é incorporada como revestimento, é produzida uma membrana externa mais densa e mais espessa (NUALKAEKUL et al., 2012).

**Figura 13** - Imagens de microscopia óptica das micropartículas com aumento de 25x: a) micropartículas de alginato (MA) b) micropartículas de alginato revestidas de quitosana (MAQ5).



Fonte: Lopes (2018).

**Figura 14** - Imagens de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas com aumento de 500x: a) micropartículas de alginato liofilizadas (MAL) b) micropartículas de alginato revestidas de quitosana liofilizadas (MAQL).



Fonte: Lopes (2019).

Os fatores de expansão de MA e MAQ5 mostraram pequena variação na distribuição de tamanho, já as MAL e MAQL apresentaram um diâmetro menos uniforme, com fatores de expansão de  $1,39 \pm 0,02$  e  $1,59 \pm 0,02$ , respectivamente. O processo de liofilização resultou em uma diminuição no diâmetro das micropartículas

com tamanho de  $793,93 \pm 10,81$  para  $740,60 \pm 13,18$   $\mu\text{m}$  para micropartículas de alginato e de  $891,43 \pm 50,92$   $\mu\text{m}$  para  $865,80 \pm 28,58$   $\mu\text{m}$  para micropartículas de alginato revestido de quitosana. Este efeito pode ser atribuído à perda de água durante o processo de liofilização. Além disso, a secagem pode resultar em aglomeração e perda da forma esférica, resultando em reduções no tamanho das micropartículas (ETCHEPARE et al., 2016).

## 6.2 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE *L. acidophilus* La-05

Os resultados da viabilidade de *L. acidophilus* La-05 e a EE estão dispostos na Tabela 1. *L. acidophilus* La-05 nas MA, MAQ5, MAL e MAQL apresentou uma contagem antes do microencapsulamento entre 8,16 e 8,24 UFC/mL. Após o microencapsulamento, a contagem celular ficou entre 8,09 e 8,10 UFC/mL para micropartículas úmidas (MA e MAQ5) e 7,57 e 7,65 UFC/mL para as micropartículas liofilizadas (MAL e MAQL). As micropartículas revestidas de quitosana a 0,7% (MAQ7) mostraram uma redução de 2,6 log UFC/mL no número de células microencapsuladas (Tabela 1). Esse resultado sugere que soluções de quitosana mais concentradas podem afetar negativamente a viabilidade de bactérias microencapsuladas (MARTÍN et al., 2015). Devido à queda na viabilidade de *L. acidophilus* La-05 em MAQ7, as MAQ5 foram escolhidas para a execução dos demais experimentos. Com exceção das MAQ7 (< 60%), todos os outros tipos de micropartículas apresentaram uma alta eficiência de encapsulação (> 90%).

Esses resultados mostram que a técnica de gelificação iônica externa foi apropriada e que os materiais microencapsulantes (alginato e quitosana a 0,5%) foram compatíveis e viáveis para produzir micropartículas contendo probióticos (HOLKEM et al., 2016). Contudo, a eficiência de encapsulação e o número de células das micropartículas revestidas de quitosana (0,5%) não foi superior ( $p \geq 0,05$ ) as micropartículas sem o revestimento. De fato, os métodos de revestimento geralmente não afetam a viabilidade probiótica nas micropartículas (CHEN et al., 2017; DARJANI et al., 2016).

O processo de liofilização resultou em uma redução < 1 log UFC/mL nas células probióticas. A liofilização é considerada uma das principais tecnologias utilizadas para obter produtos probióticos secos, pois evita o estresse oxidativo e os danos térmicos nas células. Apesar dessa técnica possivelmente resultar em reduções na

sobrevivência probiótica após sua aplicação devido principalmente à formação de cristais de gelo durante o congelamento (HALIM et al., 2017; GUEDES et al., 2019). As micropartículas liofilizadas apresentaram contagens probióticas superiores a 7 log UFC/mL e uma alta eficiência de microencapsulação (> 90%).

**Tabela 1** - Contagem (log UFC/mL) de células viáveis antes e após a microencapsulação de *L. acidophilus* La-05 e a eficiência de encapsulação

Tipos de Micropartículas	Contagem de células viáveis (log UFC/mL)		EE (%)
	Número de células iniciais	Número de células microencapsuladas	
MA	8,16 ± 0,03 <sup>a</sup>	8,09 ± 0,02 <sup>a</sup>	99,27 ± 0,59 <sup>a</sup>
MAQ5	8,20 ± 0,04 <sup>a</sup>	8,10 ± 0,02 <sup>a</sup>	99,33 ± 0,15 <sup>a</sup>
MAQ7	8,19 ± 0,10 <sup>a</sup>	5,31 ± 0,13 <sup>c</sup>	64,82 ± 0,83 <sup>c</sup>
MAL	8,23 ± 0,02 <sup>a</sup>	7,65 ± 0,08 <sup>b</sup>	92,68 ± 1,12 <sup>b</sup>
MAQL	8,24 ± 0,01 <sup>a</sup>	7,57 ± 0,06 <sup>b</sup>	91,87 ± 0,91 <sup>b</sup>

MA: micropartículas de alginato; MAQ5: micropartículas de alginato revestida de quitosana com concentração de 0,5%; MAQ7: micropartículas de alginato revestidas de quitosana com concentração de 0,7%; MAL: micropartículas de alginato liofilizadas; MAQL: micropartículas de alginato revestidas de quitosana com concentração de 0,5% liofilizadas. Os valores expressos são médias de seis ensaios independentes ± desvio padrão. <sup>a-c</sup>: letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste de Tukey.

### 6.3 VIABILIDADE DE *L. acidophilus* La-05 MICROENCAPSULADO DURANTE ARMAZENAMENTO

A Tabela 2 apresenta a viabilidade de *L. acidophilus* La-05 livre e microencapsulado (MA e MAQ5) durante o armazenamento refrigerado (7 °C). A contagem celular da cepa em sua forma livre apresentou ao final de 28 dias de armazenamento uma redução de 4,84 log UFC/mL. No mesmo período, *L. acidophilus* La-05 microencapsulado mostrou maior sobrevivência ( $p < 0,05$ ), com uma redução de 1,7 log UFC/mL para MA e de 1,6 log UFC/mL para MAQ5. O revestimento de quitosana na micropartícula de alginato (MAQ5) promoveu uma maior proteção ao probiótico ( $p < 0,05$ ). Esses resultados podem estar relacionados à capacidade do gel de alginato e do revestimento de quitosana de formar uma barreira física contra as condições de estresse, preservando a viabilidade do probiótico durante o armazenamento (DE PRISCO et al., 2015; ETCHEPARE et al., 2016).

**Tabela 2** - Contagem (log UFC/mL) de *L. acidophilus* La-05 microencapsulado durante 28 dias de armazenamento refrigerado (7 °C)

Amostras	Tempo (dias)				
	0	7	14	21	28
Células livres	8,13 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	6,45 ± 0,09 <sup>Bb</sup>	5,92 ± 0,06 <sup>Cb</sup>	4,31 ± 0,17 <sup>Dc</sup>	3,29 ± 0,12 <sup>Ec</sup>
MA	8,04 ± 0,06 <sup>Ab</sup>	8,01 ± 0,09 <sup>Aa</sup>	7,13 ± 0,13 <sup>Ba</sup>	6,70 ± 0,01 <sup>Cb</sup>	6,32 ± 0,03 <sup>Db</sup>
MAQ5	8,12 ± 0,05 <sup>Aa</sup>	7,92 ± 0,02 <sup>Ba</sup>	7,10 ± 0,04 <sup>Ca</sup>	6,93 ± 0,10 <sup>Da</sup>	6,48 ± 0,06 <sup>Ea</sup>

MA: micropartículas de alginato; MAQ5: micropartículas de alginato revestidas de quitosana com concentração de 0,5%. Os valores expressos são médias de três ensaios independentes ± desvio padrão. <sup>a-c</sup>: letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste de Tukey. <sup>A-E</sup>: letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste de Tukey.

A viabilidade de *L. acidophilus* La-05 em micropartículas liofilizadas foram avaliadas durante um período mais longo (120 dias a 7 °C) (Tabela 3). As contagens das células livres liofilizadas diminuíram aproximadamente 1,8, 2,89 e 3,57 log UFC/mL após 30, 60 e 120 dias de armazenamento refrigerado. Por outro lado, as contagens da cultura probiótica em MAL e MAQL diminuiu ~1 log UFC/mL apenas após 90 dias de armazenamento ( $p < 0,05$ ). Portanto, a liofilização das micropartículas contendo *L. acidophilus* La-05 (MAL e MAQL) resultou em uma maior sobrevivência ( $p < 0,05$ ) da cepa probiótica durante 120 dias de armazenamento (Tabela 2). Contudo, o revestimento de quitosana nas micropartículas de alginato liofilizadas (MAQL) não proporcionou um efeito protetor maior ao probiótico ( $p \geq 0,05$ ).

**Tabela 3** - Contagem (log UFC/mL) de *L. acidophilus* La-05 em micropartículas liofilizadas durante 120 dias de armazenamento refrigerado (7 °C)

Amostras	Tempo (dias)						
	0	7	15	30	60	90	120
Células livres	7,44 ± 0,08 <sup>Ab</sup>	7,31 ± 0,09 <sup>Bb</sup>	6,68 ± 0,04 <sup>Cc</sup>	5,55 ± 0,09 <sup>Dc</sup>	4,87 ± 0,04 <sup>Eb</sup>	4,55 ± 0,02 <sup>Fc</sup>	3,87 ± 0,05 <sup>Gb</sup>
MAL	7,69 ± 0,13 <sup>Aa</sup>	7,44 ± 0,01 <sup>Bab</sup>	7,33 ± 0,12 <sup>Ba</sup>	7,00 ± 0,01 <sup>Ca</sup>	6,78 ± 0,02 <sup>Da</sup>	6,66 ± 0,16 <sup>DEa</sup>	6,59 ± 0,11 <sup>Ea</sup>
MAQL	7,57 ± 0,07 <sup>Aab</sup>	7,50 ± 0,12 <sup>Aa</sup>	6,89 ± 0,02 <sup>Bb</sup>	6,87 ± 0,02 <sup>BCb</sup>	6,70 ± 0,17 <sup>Ca</sup>	6,46 ± 0,18 <sup>Db</sup>	6,27 ± 0,09 <sup>Ea</sup>

MAL: micropartículas de alginato liofilizadas; MAQL: micropartículas de alginato revestidas de quitosana com concentração de 0,5% liofilizadas. Os valores expressos são médias de três ensaios independentes ± desvio padrão. <sup>a-c</sup>: letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste de Tukey. <sup>A-G</sup>: letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste de Tukey.

As contagens mínimas sugeridas para produtos probióticos foram reportadas sendo de 6 log UFC/mL (GUEDES et al., 2019). Assim, *L. acidophilus* La-05 em sua forma livre poderia ser considerado probiótico por 7 dias, já a cepa livre liofilizada durante 15 dias de armazenamento refrigerado. *L. acidophilus* La-05

microencapsulado em MA e MAQ5 poderiam ser considerados probióticos durante 28 dias, e em micropartículas liofilizadas (MAL e MAQL) durante 120 dias de armazenamento. A liofilização das micropartículas aumentou a vida útil da cepa probiótica em pelo menos 105 dias. Ao remover a água, o processo de liofilização limita as reações químicas e as atividades metabólicas, proporcionando maior estabilidade aos probióticos por um período de armazenamento mais prolongado (BROECKX et al., 2016; GUEDES et al., 2019).

#### 6.4 VIABILIDADE DE *L. acidophilus* La-05 MICROENCAPSULADO DURANTE EXPOSIÇÃO A DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE

A Tabela 4 apresenta a viabilidade de *L. acidophilus* La-05 livres e em micropartículas liofilizadas durante exposição a diferentes condições de estresse. Após exposição ao estresse térmico, as células livres liofilizadas diminuíram ( $p < 0,05$ ) ~4 log UFC/mL. Como esperado, a redução no número de células viáveis aumentou com o aumento da temperatura. Por outro lado, *L. acidophilus* La-05 em MAL e MAQL diminuíram menos de 1 log UFC/mL após os tratamentos térmicos testados (Tabela 4). Este resultado é relevante, pois um dos principais fatores que determinam o uso de culturas probióticas no processamento de alimentos é a resistência térmica (VERRUCK; DANTAS; PRUDENCIO, 2019). Segundo Yao et al. (2017) o aquecimento é um processo usado com frequência na indústria alimentícia e se torna essencial na fabricação de produtos probióticos que a cepa utilizada se mantenha viável após o processamento do alimento.

As células livres liofilizadas não foram capazes de manter uma contagem celular  $> 6$  log UFC/mL em todas as temperaturas a que foram submetidas. Em contrapartida, MAL e MAQL mantiveram a contagem celular de *L. acidophilus* La-05 acima de 7 log UFC/mL, indicando que foram resistentes e que protegeram a cepa probiótica do calor e subsequente exposição ao frio, sendo viáveis para serem incorporadas em produtos submetidos a estresse térmico. Não foram observadas diferenças entre MAL e MAQL, independente da temperatura avaliada. Portanto, não houve impacto do revestimento de quitosana na resistência ao calor da cultura probiótica ( $p \geq 0,05$ ).

O efeito de diferentes concentrações de NaCl sobre *L. acidophilus* La-05 livres e em micropartículas liofilizadas foi demonstrado na Tabela 4. As células livres liofilizadas de *L. acidophilus* La-05 diminuíram ( $p < 0,05$ ) entre 1 e 2,5 log UFC/mL após a exposição ao NaCl. A viabilidade da cepa diminuiu à medida que a concentração de NaCl aumentou ( $p < 0,05$ ). *L. acidophilus* La-05 em MAL e MAQL, mostraram reduções ( $p < 0,05$ ) inferiores a 1 log UFC/mL (Tabela 4). O NaCl é um ingrediente sempre presente na fabricação de alimentos, no entanto, em produtos probióticos, a concentração de sal adicionada pode comprometer a viabilidade celular, pois a sobrevivência da cepa na presença de NaCl pode ser fortemente afetada pela redução da atividade da água e aumento da osmolaridade (SABIKHI et al., 2010).

As células livres liofilizadas foram capazes de sobreviver em contagens superiores a 6 log UFC/mL após exposição ao NaCl a 1,0 e 1,5%, mas apresentaram contagens mais baixas (5,09 - 5,74 UFC/mL) a 2,0% por 2 e 3 h (Tabela 4). Em ambas as micropartículas avaliadas (MAL e MAQL), a cultura probiótica manteve a viabilidade celular acima de 6 log UFC/mL em todas as concentrações e tempo, indicando ser viáveis para serem incorporadas em produtos adicionados com até 2,0% de NaCl. Não foram observadas diferenças ( $p \geq 0,05$ ) entre MAL e MAQL, independente do tempo de exposição e da concentração de NaCl.

Os resultados de viabilidade de *L. acidophilus* La-05 livres e em micropartículas liofilizadas durante exposição a diferentes valores de pH também está disposto na Tabela 4. As células livres liofilizadas reduziram ( $p < 0,05$ ) entre 1 e 3,6 log UFC/mL após serem expostas aos diferentes valores de pH. A viabilidade diminuiu à medida que os valores de pH diminuíram e o tempo de exposição aumentou ( $p < 0,05$ ). Para *L. acidophilus* La-05 em MAL e MAQL, foram observadas reduções ( $p < 0,05$ )  $< 1$  log UFC/mL. Esses dados mostram que a microencapsulação ajudou os probióticos a manter a viabilidade durante a exposição em ambiente ácido. As células livres foram capazes de sobreviver em contagens  $> 6$  log UFC/mL após exposição ao pH 6 e 4, mas apresentaram contagens mais baixas (4,13 - 5,10 UFC/mL) a pH 2 por 2 e 3 h (Tabela 4).

Em ambas as micropartículas testadas, o probiótico manteve a viabilidade acima de 6 log UFC/mL em todos os pH e tempos, indicando serem viáveis para incorporação em produtos com acidez muito alta. De maneira geral, foram observadas diferenças ( $p < 0,05$ ) entre a contagem de células viáveis de MAL e MAQL. Em pH 6 e 4, micropartículas de alginato revestidas de quitosana mostraram uma menor

viabilidade da cepa probiótica, já em pH 2, a incorporação da quitosana aumentou a sobrevivência probiótica ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4). Os resultados sugerem que o revestimento de quitosana promove uma maior proteção ao probiótico em valores de pH muito baixos. De fato, a quitosana quando usada com o alginato apresenta benefícios adicionais, pois é capaz de tamponar o excesso de prótons, mitigando o ambiente ácido através da pronação de seus grupos amina que possui um pKa de ~6,2 (LING et al., 2019).

**Tabela 4** - Contagem (log UFC/mL) de *L. acidophilus* La-05 microencapsulado exposto a diferentes condições de estresse

Condições de estresse	Tempo (h)	Contagem de células viáveis (log UFC/mL)			
		Células livres	MAL	MAQL	
<b>Temperatura</b>	Sem exposição	7,71 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	7,69 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	7,70 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	
	72 °C	5,50 ± 0,08 <sup>Bb</sup>	7,62 ± 0,01 <sup>Ab</sup>	7,62 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	
	85 °C	4,56 ± 0,08 <sup>Bc</sup>	7,45 ± 0,01 <sup>Ac</sup>	7,51 ± 0,07 <sup>Ab</sup>	
	90 °C	3,66 ± 0,07 <sup>Bd</sup>	7,33 ± 0,04 <sup>Ad</sup>	7,23 ± 0,09 <sup>Ac</sup>	
<b>NaCl</b>	Sem exposição	7,68 ± 0,04 <sup>Aa</sup>	7,60 ± 0,04 <sup>Ba</sup>	7,49 ± 0,02 <sup>Ca</sup>	
	1,0%	1	7,39 ± 0,01 <sup>Bb</sup>	7,64 ± 0,11 <sup>Aa</sup>	7,47 ± 0,02 <sup>Ba</sup>
		2	7,02 ± 0,01 <sup>Cc</sup>	7,61 ± 0,04 <sup>Aa</sup>	7,32 ± 0,07 <sup>Bb</sup>
		3	6,35 ± 0,09 <sup>Be</sup>	7,34 ± 0,06 <sup>Abc</sup>	7,22 ± 0,11 <sup>Abc</sup>
	1,5%	1	7,08 ± 0,04 <sup>Cc</sup>	7,32 ± 0,08 <sup>bcB</sup>	7,43 ± 0,02 <sup>abA</sup>
		2	6,80 ± 0,08 <sup>Bd</sup>	7,25 ± 0,02 <sup>bcA</sup>	7,28 ± 0,01 <sup>bcA</sup>
		3	6,20 ± 0,06 <sup>Bf</sup>	7,10 ± 0,06 <sup>cA</sup>	7,14 ± 0,09 <sup>cA</sup>
	2,0%	1	6,99 ± 0,03 <sup>Bc</sup>	7,36 ± 0,03 <sup>Ab</sup>	7,39 ± 0,02 <sup>Aab</sup>
		2	5,74 ± 0,07 <sup>Bg</sup>	7,25 ± 0,01 <sup>Ac</sup>	7,18 ± 0,08 <sup>Ac</sup>
		3	5,09 ± 0,06 <sup>Bh</sup>	7,22 ± 0,08 <sup>Ac</sup>	7,16 ± 0,01 <sup>Ac</sup>
	<b>pH</b>	Sem exposição	7,76 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	7,63 ± 0,01 <sup>Ba</sup>	7,59 ± 0,09 <sup>Ba</sup>
		6,0	1	7,45 ± 0,09 <sup>Ab</sup>	7,43 ± 0,11 <sup>Aab</sup>
2			7,22 ± 0,08 <sup>ABc</sup>	7,35 ± 0,13 <sup>Ab</sup>	7,12 ± 0,07 <sup>Bbc</sup>
3			7,12 ± 0,02 <sup>Bc</sup>	7,29 ± 0,11 <sup>Ab</sup>	7,13 ± 0,02 <sup>Bbc</sup>
4,0		1	7,33 ± 0,02 <sup>Ab</sup>	7,30 ± 0,08 <sup>ABb</sup>	7,23 ± 0,09 <sup>Bb</sup>
		2	6,29 ± 0,01 <sup>Cd</sup>	7,37 ± 0,01 <sup>Ab</sup>	7,13 ± 0,13 <sup>Bbc</sup>
		3	6,13 ± 0,08 <sup>Ce</sup>	7,30 ± 0,11 <sup>Ab</sup>	7,08 ± 0,08 <sup>Bc</sup>
2,0		1	6,20 ± 0,07 <sup>Cde</sup>	6,59 ± 0,04 <sup>Bc</sup>	7,08 ± 0,02 <sup>Abc</sup>
		2	5,10 ± 0,10 <sup>Cf</sup>	6,23 ± 0,08 <sup>Bd</sup>	6,71 ± 0,02 <sup>Accd</sup>
		3	4,13 ± 0,08 <sup>Cg</sup>	6,16 ± 0,10 <sup>Bd</sup>	6,47 ± 0,01 <sup>Ae</sup>

MAL: micropartículas de alginato liofilizadas; MAQL: micropartículas de alginato revestidas de quitosana com concentração de 0,5% liofilizadas. Os valores expressos são médias de três ensaios independentes ± desvio padrão. <sup>a-h</sup>: letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre a contagem de células viáveis das células livres ou microencapsuladas quando expostas a diferentes condições de estresse, de acordo com o teste de Tukey. <sup>A-C</sup>: letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença ( $p < 0,05$ ) na contagem de células viáveis entre as amostras de células livres e microencapsuladas quando exposta à mesma condição de estresse, de acordo com o teste de Tukey.

A sobrevivência de *L. acidophilus* La-05 em micropartículas liofilizadas (MAL e MAQL) durante exposição a diferentes condições de estresse sugerem que a

microencapsulação foi uma metodologia adequada para aumentar a resistência probiótica ao tratamento térmico, presença de NaCl e valores baixos de pH, resultando em contagens probióticas  $> 6 \log \text{ UFC/mL}$ , mesmo quando altas temperaturas ( $90 \text{ }^\circ\text{C}$ ), concentração de NaCl a 2,0% ou baixos valores de pH (pH 2) foram utilizados. Isso é importante ao se considerar a aplicação da cultura probiótica em produtos alimentícios, quando tratamento térmico, concentrações de 2,0% de NaCl e baixos valores de pH são comumente encontrados. Em produtos com alta acidez (pH 2), aconselha-se usar a quitosana como material de revestimento nas micropartículas de alginato.

#### 6.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS EXTRATOS HIDROSSOLÚVEIS DE ARROZ E SOJA E VIABILIDADE DE *L. acidophilus* La-05 MICROENCAPSULADO DURANTE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO

A Tabela 5 apresenta a caracterização físico-química dos extratos hidrossolúveis vegetais durante o armazenamento refrigerado ( $7 \text{ }^\circ\text{C}$ ). O extrato hidrossolúvel de arroz apresentou pH entre 6,31-6,76, sólidos solúveis totais (SST) entre 1,50-12,03  $^\circ\text{Brix}$  e cor branca ( $L^* = 61,08-66,53$ ;  $a^* = -0,58- -1,59$ ;  $b^* = 2,29-6,73$ ), enquanto o extrato hidrossolúvel de soja apresentou pH entre 6,65-6,82, SST entre 6,93-16,50  $^\circ\text{Brix}$  e cor amarela ( $L^* = 59,41-62,60$ ;  $a^* = -0,10- -1,49$ ;  $b^* = 8,21-11,91$ ).

O extrato hidrossolúvel de soja apresentou maior valor de pH e teor de sólidos solúveis totais que o extrato hidrossolúvel de arroz ( $p < 0,05$ ). O maior valor de pH pode ser explicado pela capacidade de tamponamento das proteínas presentes no extrato de soja (SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2020). O maior teor de sólidos solúveis totais está associado à composição química dos extratos hidrossolúveis vegetais, uma vez que o extrato de soja é caracterizada por uma maior concentração de lipídeos, proteínas e cinzas do que o extrato de arroz (ABOU-DOBARA, ISMAIL; REFAAT, 2016).

Para os dois extratos hidrossolúveis, a incorporação das micropartículas (MAL e MAQL) resultou em valores mais altos de pH e sólidos solúveis, além de uma coloração mais escura (menores valores de  $L^*$ ,  $p < 0,05$ , dia 0) (Tabela 5). O alginato de sódio tem uma cor entre o branco e o amarelo, o que pode contribuir para alterar a cor dos produtos alimentícios (HOLKEM et al., 2016). Os materiais

microencapsulantes utilizados (3% de alginato e 0,5% de quitosana) provavelmente ocasionaram o aumento dos valores de sólidos solúveis. Além disso, ambos os componentes (alginato e quitosana) têm natureza básica, o que pode ter resultado em maiores valores de pH. A incorporação de quitosana nas micropartículas de alginato (MAQL) resultou em produtos com os maiores valores de sólidos solúveis e cor amarela mais acentuada (maiores valores de  $b^*$ ,  $p < 0,05$ ).

Os resultados sugerem que a incorporação das micropartículas probióticas nos extratos hidrossolúveis vegetais impactou nas características físico-químicas, independentemente da matéria-prima utilizada (arroz ou soja). Os valores mais altos de pH e sólidos solúveis totais observados nos extratos hidrossolúveis contendo micropartículas probióticas podem ser positivos do ponto de vista do consumidor, pois são esperados no mercado produtos com baixa acidez e levemente adocicados. Além disso, o pH mais elevado pode resultar em uma maior sobrevivência das culturas probióticas, pois a viabilidade celular reduzida é observada em produtos com baixos valores de pH (COSTA et al., 2019).

Durante o período de armazenamento, os extratos hidrossolúveis vegetais contendo micropartículas probióticas liofilizadas (MAL e MAQL) comportaram-se de forma diferente daqueles com células livres liofilizadas ( $p < 0,05$ , Tabela 5). Para o extrato hidrossolúvel de arroz contendo MAL e MAQL, as alterações observadas no dia 0 de armazenamento foram mais pronunciadas, ou seja, houve um aumento nos valores de pH e sólidos solúveis totais e um aumento na cor amarela (maiores valores de  $b^*$ ) ( $p < 0,05$ ). Para o extrato hidrossolúvel de soja, em uma visão geral, a adição das micropartículas de alginato (MAL) manteve as características durante o armazenamento (pH, sólidos solúveis totais,  $L^*$  e  $a^*$ ) semelhantes ao produto com células livres liofilizadas ( $p \geq 0,05$ , Tabela 5).

A incorporação de quitosana nas micropartículas de alginato (MAQL) resultou em produtos com menores valores de sólidos solúveis e cores mais claras (maiores valores de  $L^*$  e menores valores de  $b^*$ ,  $p < 0,05$ ) após 7 dias de armazenamento. A diminuição dos valores de sólidos solúveis para o extrato hidrossolúvel de soja contendo MAQL provavelmente está relacionada ao consumo de açúcar pelas culturas probióticas, sugerindo que a sobrevivência do probiótico foi melhorada nessa matriz.

**Tabela 5** - Características físico-químicas de extratos hidrossolúveis de arroz e soja durante 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C)

Parâmetros	Dias de armazenamento	Arroz			Soja		
		Células livres	MAL	MAQL	Células livres	MAL	MAQL
pH	0	6,33 ± 0,02 <sup>Da</sup>	6,54 ± 0,01 <sup>Cb</sup>	6,54 ± 0,01 <sup>Cb</sup>	6,65 ± 0,01 <sup>Bb</sup>	6,66 ± 0,01 <sup>Bb</sup>	6,75 ± 0,01 <sup>Ab</sup>
	7	6,31 ± 0,01 <sup>Da</sup>	6,75 ± 0,01 <sup>Ba</sup>	6,76 ± 0,01 <sup>Ba</sup>	6,70 ± 0,03 <sup>Ca</sup>	6,69 ± 0,01 <sup>Ca</sup>	6,82 ± 0,01 <sup>Aa</sup>
Sólidos solúveis totais	0	1,50 ± 0,20 <sup>Fa</sup>	8,20 ± 0,10 <sup>Db</sup>	10,50 ± 0,20 <sup>Cb</sup>	7,43 ± 0,06 <sup>Ea</sup>	14,77 ± 0,06 <sup>Ba</sup>	16,50 ± 0,90 <sup>Aa</sup>
	7	1,93 ± 0,11 <sup>Ea</sup>	11,17 ± 0,06 <sup>Ca</sup>	12,03 ± 0,15 <sup>Ba</sup>	6,93 ± 0,12 <sup>Da</sup>	14,83 ± 0,25 <sup>Aa</sup>	14,33 ± 0,06 <sup>Ab</sup>
<b>Cor</b>							
L*	0	66,53 ± 0,07 <sup>Aa</sup>	61,08 ± 0,18 <sup>Eb</sup>	64,67 ± 0,11 <sup>Ba</sup>	62,54 ± 0,16 <sup>Ca</sup>	59,41 ± 0,17 <sup>Fa</sup>	61,43 ± 0,26 <sup>Db</sup>
	7	66,07 ± 0,06 <sup>Ab</sup>	61,99 ± 0,39 <sup>Da</sup>	63,24 ± 0,17 <sup>Bb</sup>	62,68 ± 0,19 <sup>Ca</sup>	59,57 ± 0,14 <sup>Ea</sup>	61,89 ± 0,10 <sup>Da</sup>
a*	0	-0,58 ± 0,01 <sup>Da</sup>	-1,59 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	-1,18 ± 0,02 <sup>Ca</sup>	-0,62 ± 0,01 <sup>Da</sup>	-1,49 ± 0,03 <sup>Ba</sup>	-0,24 ± 0,02 <sup>Ea</sup>
	7	-0,59 ± 0,02 <sup>Ca</sup>	-1,22 ± 0,04 <sup>Ab</sup>	-1,20 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	-0,39 ± 0,02 <sup>Db</sup>	-0,76 ± 0,03 <sup>Bb</sup>	-0,10 ± 0,03 <sup>Eb</sup>
b*	0	2,79 ± 0,02 <sup>Ea</sup>	2,60 ± 0,05 <sup>Eb</sup>	6,07 ± 0,03 <sup>Db</sup>	8,69 ± 0,01 <sup>Ba</sup>	8,32 ± 0,16 <sup>Cb</sup>	11,91 ± 0,25 <sup>Aa</sup>
	7	2,29 ± 0,07 <sup>Fb</sup>	4,63 ± 0,09 <sup>Ea</sup>	6,73 ± 0,03 <sup>Da</sup>	8,21 ± 0,14 <sup>Cb</sup>	8,80 ± 0,05 <sup>Ba</sup>	10,71 ± 0,16 <sup>Ab</sup>

MAL: micropartículas de alginato liofilizadas; MAQL: micropartículas de alginato revestidas de quitosana com concentração de 0,5% liofilizadas. Os valores expressos são médias de três ensaios independentes ± desvio padrão. <sup>a-b</sup>: letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tempos de armazenamento da mesma amostra, de acordo com o teste de Tukey. <sup>A-F</sup>: letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre as diferentes amostras no mesmo tempo de armazenamento, de acordo com o teste de Tukey.

A Tabela 6 apresenta a viabilidade de *L. acidophilus* La-05 em micropartículas liofilizadas durante o armazenamento refrigerado (7 °C) quando incorporadas em extratos hidrossolúveis de arroz e soja. As células livres liofilizadas diminuíram ( $p < 0,05$ ) ~1 log UFC/mL durante o armazenamento em ambos os extratos hidrossolúveis. Para *L. acidophilus* La-05 em MAL e MAQL, foram observadas reduções ( $p < 0,05$ ) de 0,38-0,63 e 0,21-0,24 log UFC/mL para os extratos de arroz e soja, respectivamente (Tabela 6).

Além disso, ao final do período de armazenamento foi observada que o revestimento de quitosana na micropartícula de alginato (MAQL) conseguiu proteger

melhor a cepa probiótica, mostrando uma maior viabilidade ( $p < 0,05$ ) em ambos os extratos. A quitosana foi capaz de cobrir a porosidade das micropartículas de alginato (Figura 14), o que aumentou a proteção física da cultura probiótica. Todas as formulações apresentaram contagens probióticas acima de 6 log UFC/mL durante o armazenamento refrigerado (7 °C por 7 dias), sugerindo que os extratos hidrossolúveis de arroz e soja são matrizes adequadas para a incorporação de culturas probióticas.

**Tabela 6** - Contagem (log UFC/mL) de *L. acidophilus* La-05 microencapsulado incorporado em extratos hidrossolúveis de arroz e soja durante 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C)

Dias de armazenamento	Contagem de células viáveis (log UFC/mL)					
	Arroz			Soja		
	Células livres	MAL	MAQL	Células livres	MAL	MAQL
0	7,53 ± 0,04 <sup>Ba</sup>	7,48 ± 0,08 <sup>Ba</sup>	7,82 ± 0,07 <sup>Aa</sup>	7,51 ± 0,04 <sup>Ba</sup>	7,33 ± 0,06 <sup>Ca</sup>	7,80 ± 0,01 <sup>Aa</sup>
3	6,66 ± 0,03 <sup>Cb</sup>	7,34 ± 0,06 <sup>Bb</sup>	7,33 ± 0,06 <sup>Bb</sup>	6,52 ± 0,09 <sup>Db</sup>	7,28 ± 0,03 <sup>Ba</sup>	7,61 ± 0,02 <sup>Ab</sup>
7	6,62 ± 0,08 <sup>Db</sup>	7,10 ± 0,03 <sup>Cc</sup>	7,19 ± 0,07 <sup>Bc</sup>	6,50 ± 0,02 <sup>Eb</sup>	7,12 ± 0,02 <sup>BCb</sup>	7,56 ± 0,09 <sup>Ab</sup>

MAL: micropartículas de alginato liofilizadas; MAQL: micropartículas de alginato revestidas de quitosana com concentração de 0,5% liofilizadas. Os valores expressos são médias de três ensaios independentes ± desvio padrão. <sup>a-c</sup>: letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tempos de armazenamento da mesma amostra, de acordo com o teste de Tukey. <sup>A-E</sup>: letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre as diferentes amostras no mesmo tempo de armazenamento, de acordo com o teste de Tukey.

## 6.6 VIABILIDADE DE *L. acidophilus* La-05 MICROENCAPSULADO INCORPORADO EM EXTRATOS HIDROSSOLÚVEIS VEGETAIS, LEITES CAPRINO E BOVINO EXPOSTOS AO TRATO GASTROINTESTINAL SIMULADO

A Tabela 7 apresenta a viabilidade de *L. acidophilus* La-05 microencapsulado durante a digestão gastrointestinal simulada quando incorporado em extratos hidrossolúveis vegetais (arroz e soja), leites caprino e bovino. Durante a digestão simulada em água destilada, as células livres liofilizadas diminuíram ~ 3 log UFC/mL após as fases do esôfago-estômago e duodeno. No final da digestão in vitro (íleo), as contagens de células livres de *L. acidophilus* La-05 estavam abaixo do limite de detecção.

Os extratos hidrossolúveis vegetais e os leites caprino e bovino forneceram maior proteção às células probióticas, pois ao final da digestão *in vitro* foram observadas contagens de 4,20 log UFC/mL no extrato de arroz, 4,38 log UFC/mL no extrato de soja, 4,81 log UFC/mL no leite caprino e 5,07 log UFC/mL no leite bovino. Esses resultados estão associados aos nutrientes que estão presentes nos extratos hidrossolúveis e nos leites, mas não na água destilada, podendo ser utilizados pelas culturas probióticas em seu metabolismo.

Embora os leites caprino e bovino tenham conferido maior proteção a cepa livre - provavelmente devido a sua composição química mais complexa e a sua maior capacidade tamponante (FAZILAH et al., 2018; MUÑOZ et al., 2018) - os extratos hidrossolúveis também se destacam como veículo de probióticos por conter substâncias com potencial prebiótico que podem proteger as células das condições adversas da digestão (KANDYLIS et al., 2016).

A microencapsulação do *L. acidophilus* La-05 (MAL e MAQL) resultou em uma maior sobrevivência durante a digestão *in vitro* ( $p < 0,05$ ). As contagens de *L. acidophilus* La-05 diminuíram ~ 1 log UFC/mL após as fases do esôfago-estômago e duodeno (Tabela 7). Ao final da digestão *in vitro* (íleo), as contagens foram superiores a 6 log UFC/mL, independentemente da matriz avaliada (água destilada, extrato hidrossolúvel de arroz, extrato hidrossolúvel de soja, leite caprino e leite bovino). A capacidade de tolerar o estresse digestivo é um dos principais requisitos para a incorporação bem-sucedida de probióticos nos alimentos. Antes de colonizar o trato intestinal, os micro-organismos devem sobreviver as alterações de pH e à ação de enzimas que ocorrem no estômago e intestino (HILL et al., 2014).

Os resultados mostram que a microencapsulação em MAL e MAQL pode melhorar a viabilidade celular de probióticos incorporados tanto em matrizes vegetais (extratos hidrossolúveis de arroz e soja), como em matrizes animais (leite caprino e bovino) quando expostos ao trato gastrointestinal. Esses dados concordam com diversos estudos (CHEN et al., 2017; DARJANI et al., 2016; ETCHEPARE et al., 2016; HALIM et al., 2017), que mostram que a tecnologia de microencapsulação mantém a viabilidade de probióticos expostos ao TGI. Apenas as amostras contendo culturas probióticas microencapsuladas apresentaram contagens consideradas suficientes (> 6 log UFC/mL) para exercer efeitos benéficos ao consumidor, após simulação da digestão (GROM et al., 2020). O revestimento de quitosana na micropartícula de alginato (MAQL) não aumentou a sobrevivência da cultura probiótica ( $p \geq 0,05$ ). O

efeito protetor da quitosana provavelmente foi suprimido pelas condições drásticas da digestão *in vitro*.

**Tabela 7** - Condições usadas durante a simulação do trato gastrointestinal e a contagem (log UFC/mL) de *L. acidophilus* microencapsulado incorporado em extratos hidrossolúveis de soja e arroz e em leites caprino e bovino após 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C)

Etapa	Solução enzimática	Agitação (rpm)	pH	Tempo (min)	Contagem de células viáveis (log UFC/mL)														
					Água destilada			Extrato hidrossolúvel de arroz			Extrato hidrossolúvel de soja			Leite caprino			Leite bovino		
					Células livres	MAL	MAQL	Células livres	MAL	MAQL	Células livres	MAL	MAQL	Células livres	MAL	MAQL	Células livres	MAL	MAQL
Antes da simulação	-	-	-	-	7,58 ± 0,09 <sup>Ba</sup>	7,70 ± 0,09 <sup>Aba</sup>	7,66 ± 0,04 <sup>Ba</sup>	7,59 ± 0,02 <sup>Ba</sup>	7,63 ± 0,10 <sup>Ba</sup>	7,61 ± 0,03 <sup>Ba</sup>	7,54 ± 0,06 <sup>Ba</sup>	7,79 ± 0,08 <sup>ABa</sup>	7,75 ± 0,05 <sup>ABa</sup>	7,63 ± 0,08 <sup>Ba</sup>	7,73 ± 0,08 <sup>ABa</sup>	7,71 ± 0,05 <sup>ABa</sup>	7,68 ± 0,04 <sup>ABa</sup>	7,81 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	7,80 ± 0,02 <sup>Aa</sup>
Esôfago-estômago	Pepsina	130	5,5	10	7,17 ± 0,17 <sup>CDb</sup>	7,28 ± 0,01 <sup>CDb</sup>	7,20 ± 0,16 <sup>CDb</sup>	7,14 ± 0,08 <sup>Db</sup>	7,41 ± 0,01 <sup>BCb</sup>	7,33 ± 0,17 <sup>Cb</sup>	7,26 ± 0,13 <sup>CDb</sup>	7,64 ± 0,03 <sup>ABb</sup>	7,51 ± 0,02 <sup>BCb</sup>	7,51 ± 0,05 <sup>BCb</sup>	7,66 ± 0,13 <sup>ABab</sup>	7,65 ± 0,05 <sup>ABa</sup>	7,58 ± 0,04 <sup>Bb</sup>	7,77 ± 0,15 <sup>Aa</sup>	7,61 ± 0,07 <sup>ABb</sup>
			4,6	10	6,39 ± 0,21 <sup>Fc</sup>	7,12 ± 0,01 <sup>Dc</sup>	6,99 ± 0,05 <sup>Dc</sup>	6,70 ± 0,11 <sup>Ec</sup>	7,37 ± 0,04 <sup>Cb</sup>	7,13 ± 0,05 <sup>Dc</sup>	7,40 ± 0,04 <sup>Cab</sup>	7,58 ± 0,02 <sup>BCb</sup>	7,54 ± 0,06 <sup>BCb</sup>	7,47 ± 0,09 <sup>Cb</sup>	7,56 ± 0,03 <sup>BCbc</sup>	7,60 ± 0,07 <sup>Ba</sup>	7,51 ± 0,06 <sup>BCc</sup>	7,74 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	7,58 ± 0,01 <sup>BCb</sup>
			3,8	10	5,76 ± 0,04 <sup>Hd</sup>	7,07 ± 0,10 <sup>Cc</sup>	6,70 ± 0,05 <sup>Dd</sup>	6,13 ± 0,04 <sup>Gd</sup>	7,12 ± 0,01 <sup>Cc</sup>	6,64 ± 0,15 <sup>Dd</sup>	6,12 ± 0,09 <sup>Gc</sup>	7,37 ± 0,07 <sup>Bc</sup>	7,31 ± 0,01 <sup>Bc</sup>	6,27 ± 0,07 <sup>Fc</sup>	7,52 ± 0,08 <sup>ABcd</sup>	7,37 ± 0,05 <sup>Bb</sup>	6,40 ± 0,02 <sup>Ed</sup>	7,62 ± 0,06 <sup>Ab</sup>	7,42 ± 0,05 <sup>Bc</sup>
			2,8	20	5,24 ± 0,05 <sup>Le</sup>	6,95 ± 0,02 <sup>Fd</sup>	6,65 ± 0,02 <sup>GHd</sup>	5,72 ± 0,01 <sup>Je</sup>	7,06 ± 0,02 <sup>Ec</sup>	6,60 ± 0,05 <sup>Hd</sup>	5,61 ± 0,07 <sup>Kd</sup>	7,18 ± 0,06 <sup>Dd</sup>	6,70 ± 0,03 <sup>Gd</sup>	5,62 ± 0,04 <sup>Kd</sup>	7,40 ± 0,02 <sup>Bd</sup>	7,27 ± 0,03 <sup>Cb</sup>	6,07 ± 0,02 <sup>Ie</sup>	7,63 ± 0,02 <sup>Ab</sup>	7,35 ± 0,01 <sup>Bd</sup>
			2,3	20	5,02 ± 0,03 <sup>lf</sup>	6,66 ± 0,06 <sup>Ee</sup>	6,48 ± 0,07 <sup>Fe</sup>	5,56 ± 0,08 <sup>Gf</sup>	6,77 ± 0,05 <sup>Ed</sup>	6,40 ± 0,02 <sup>Fe</sup>	5,58 ± 0,08 <sup>GHd</sup>	6,94 ± 0,04 <sup>De</sup>	6,67 ± 0,01 <sup>Ed</sup>	5,48 ± 0,08 <sup>HGe</sup>	7,42 ± 0,12 <sup>Bd</sup>	7,29 ± 0,17 <sup>BCb</sup>	5,68 ± 0,01 <sup>Gf</sup>	7,61 ± 0,03 <sup>Ab</sup>	7,15 ± 0,04 <sup>Ce</sup>
			2,0	20	4,37 ± 0,02 <sup>Hg</sup>	6,50 ± 0,05 <sup>CDf</sup>	6,30 ± 0,11 <sup>Ef</sup>	4,45 ± 0,02 <sup>Hg</sup>	6,51 ± 0,06 <sup>CDe</sup>	6,41 ± 0,02 <sup>De</sup>	5,03 ± 0,02 <sup>Ge</sup>	6,81 ± 0,08 <sup>Bf</sup>	6,52 ± 0,02 <sup>Ce</sup>	5,08 ± 0,04 <sup>Gf</sup>	7,20 ± 0,05 <sup>Ae</sup>	6,93 ± 0,04 <sup>Bc</sup>	5,29 ± 0,01 <sup>Fg</sup>	7,21 ± 0,01 <sup>Ac</sup>	6,91 ± 0,01 <sup>Bf</sup>
Duodeno	Pancreatina + Sais biliares	45	5,0	30	4,02 ± 0,01 <sup>lh</sup>	6,37 ± 0,02 <sup>CDg</sup>	6,27 ± 0,13 <sup>Df</sup>	4,36 ± 0,04 <sup>Hg</sup>	6,45 ± 0,02 <sup>Ce</sup>	6,31 ± 0,07 <sup>Def</sup>	4,63 ± 0,03 <sup>Gf</sup>	6,72 ± 0,02 <sup>Bg</sup>	6,41 ± 0,09 <sup>CDf</sup>	4,90 ± 0,01 <sup>Fg</sup>	7,02 ± 0,01 <sup>Af</sup>	6,80 ± 0,13 <sup>Bc</sup>	5,12 ± 0,02 <sup>EH</sup>	7,07 ± 0,03 <sup>Ad</sup>	6,75 ± 0,04 <sup>Bg</sup>
Ileo	-	45	6,5	60	nd	6,20 ± 0,04 <sup>Ch</sup>	6,22 ± 0,02 <sup>Cf</sup>	4,20 ± 0,10 <sup>Gh</sup>	6,32 ± 0,08 <sup>Cf</sup>	6,23 ± 0,09 <sup>Cf</sup>	4,38 ± 0,15 <sup>Fg</sup>	6,56 ± 0,02 <sup>Bh</sup>	6,32 ± 0,08 <sup>Cg</sup>	4,81 ± 0,04 <sup>Eg</sup>	6,77 ± 0,10 <sup>Ag</sup>	6,54 ± 0,01 <sup>Bd</sup>	5,07 ± 0,02 <sup>Dh</sup>	6,72 ± 0,01 <sup>Ae</sup>	6,51 ± 0,02 <sup>Bh</sup>

Etapa 1 a 6: simulação das condições do esôfago-estômago; Etapa 7: simulação das condições do duodeno; Etapa 8: simulação das condições do íleo; MAL: micropartículas de alginato liofilizadas; MAQL: micropartículas de alginato revestidas de quitosana com concentração de 0,5% liofilizadas. nd: não detectado. Os valores expressos são médias de três ensaios independentes ± desvio padrão. <sup>a-h</sup>: letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre a contagem de células viáveis para a cepa livre ou microencapsulada quando testadas em água destilada, extratos hidrossolúveis vegetais, leites caprino e bovino e expostas a diferentes etapas da simulação da digestão, de acordo com o teste de Tukey. <sup>A-L</sup>: letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre a contagem de células viáveis para a

cepa livre ou microencapsulada quando testada em água destilada, extratos hidrossolúveis vegetais, leites caprino e bovino expostas a mesma etapa da simulação da digestão, de acordo com o teste de Tukey.

## 6.7 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E VIABILIDADE DE *L. acidophilus* La-05 MICROENCAPSULADO INCORPORADO EM CREME DE RICOTA CAPRINO DURANTE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO

As amostras de creme de ricota caprino apresentaram qualidade microbiológica satisfatória durante o armazenamento (7 °C por 7 dias), conforme estabelecido pela legislação brasileira em vigor (BRASIL, 2001), com contagens < 0,3 NMP/g para coliformes totais e termotolerantes e ausência de *Staphylococcus* coagulase positivo, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*.

A Tabela 8 apresenta a viabilidade de *L. acidophilus* La-05 em micropartículas liofilizadas durante o armazenamento refrigerado (7 °C) quando incorporadas em creme de ricota de cabra. As formulações contendo probióticos (livres e microencapsulados) mostraram contagens semelhantes de *L. acidophilus* La-05 ( $p \geq 0,05$ ) no 1º dia de armazenamento, sugerindo que foram adicionadas na mesma concentração.

**Tabela 8** - Contagem (log UFC/mL) de *L. acidophilus* La-05 microencapsulado incorporado em creme de ricota caprino durante 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C)

Time (days)	Contagem de células viáveis (log UFC/mL)		
	Células livres	MAL	MAQL
0	7,28 ± 0,10 <sup>Aa</sup>	7,15 ± 0,21 <sup>Aa</sup>	7,20 ± 0,09 <sup>Aa</sup>
7	6,88 ± 0,01 <sup>Bb</sup>	7,18 ± 0,09 <sup>Aa</sup>	7,24 ± 0,05 <sup>Aa</sup>

MAL: micropartículas de alginato liofilizadas; MAQL: micropartículas de alginato revestidas de quitosana com concentração de 0,5% liofilizadas. Os valores expressos são médias de três ensaios independentes ± desvio padrão. <sup>a-b</sup>: letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tempos de armazenamento da mesma amostra, de acordo com o teste de Tukey. <sup>A-B</sup>: letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre as diferentes amostras no mesmo tempo de armazenamento, de acordo com o teste de Tukey.

Durante o período de armazenamento, a incorporação de *L. acidophilus* La-05 microencapsulado (MAL e MAQL) resultou em maior sobrevivência ( $p < 0,05$ ) do que as células livres, sugerindo que a microencapsulação do probiótica em alginato-quitosana foi eficaz em isolar a cepa da matriz alimentar, protegendo de condições de

estresse e mantendo sua viabilidade durante o armazenamento. Não foi observado diferença entre as matrizes microencapsulantes (MAL e MAQL;  $p \geq 0,05$ ). Todas as amostras puderam ser consideradas probióticas durante o período de armazenamento, uma vez que a concentração mínima de probióticos necessária para exercer seus efeitos benéficos é  $> 10^6$  UFC/g (GRANATO et al., 2010).

#### 6.8 VIABILIDADE DE *L. acidophilus* La-05 MICROENCAPSULADO INCORPORADO EM CREME DE RICOTA CAPRINO EXPOSTO AO TRATO GASTROINTESTINAL SIMULADO

A Tabela 9 apresenta a viabilidade de *L. acidophilus* La-05 microencapsulado incorporado em creme de ricota caprino durante a digestão gastrointestinal simulada. Antes da exposição ao TGI todas as amostras apresentaram contagem de 7 log UFC/mL ( $p \geq 0,05$ ). As amostras contendo células livres liofilizadas apresentaram uma diminuição  $> 1$  log UFC/mL na passagem pelo esôfago-estômago (após a quarta etapa digestiva). Ao final da digestão in vitro (íleo), as contagens de *L. acidophilus* livres foram de 5,31 log UFC/mL.

A microencapsulação (MAL e MAQL) promoveu maior sobrevivência da cepa ( $p < 0,05$ ) com uma diminuição  $< 1$  log UFC/mL, resultando em uma contagem de 6,00-6,06 log UFC/mL. No final da digestão in vitro não foi observado diferença entre as micropartículas MAL e MAQL ( $p \geq 0,05$ ). Para fornecer os efeitos benéficos à saúde, pelo menos 6 log UFC/mL devem atingir o intestino inferior (GROM et al., 2020). Portanto, a microencapsulação foi eficiente na proteção da cepa em todo o trato gastrointestinal simulado, e apenas os cremes de ricota contendo probióticos microencapsulados apresentaram contagens adequadas.

**Tabela 9** - Condições usadas durante a simulação do trato gastrointestinal e a contagem (log UFC/mL) de *L. acidophilus* microencapsulado incorporado em creme de ricota caprino após 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C)

Etapa	Solução enzimática	Agitação (rpm)	pH	Tempo (min)	Contagem de células viáveis (log UFC/mL)		
					Células livres	MAL	MAQL
Antes da simulação	-	-	-	-	7,03 ± 0,06 <sup>Aa</sup>	7,00 ± 0,08 <sup>Aa</sup>	7,04 ± 0,06 <sup>Aa</sup>
Esôfago-estômago	Pepsina	130	5,5	10	7,02 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	7,03 ± 0,10 <sup>Aa</sup>	7,06 ± 0,01 <sup>Aa</sup>
			4,6	10	6,98 ± 0,06 <sup>Aab</sup>	6,95 ± 0,08 <sup>Aa</sup>	7,00 ± 0,08 <sup>Aa</sup>
			3,8	10	6,89 ± 0,04 <sup>Aab</sup>	6,39 ± 0,06 <sup>Bb</sup>	6,79 ± 0,04 <sup>Ab</sup>
			2,8	20	6,82 ± 0,04 <sup>Ab</sup>	6,14 ± 0,04 <sup>Bbc</sup>	6,30 ± 0,05 <sup>Bc</sup>
			2,3	20	6,48 ± 0,06 <sup>Ac</sup>	6,10 ± 0,09 <sup>Bbc</sup>	6,21 ± 0,03 <sup>ABcd</sup>
			2,0	20	5,98 ± 0,04 <sup>Cd</sup>	6,07 ± 0,07 <sup>Bc</sup>	6,18 ± 0,03 <sup>Acd</sup>
Duodeno	Pancreatina + Sais biliares	45	5,0	30	5,82 ± 0,01 <sup>Bd</sup>	6,06 ± 0,08 <sup>ABc</sup>	6,13 ± 0,06 <sup>Acd</sup>
Ileo	-	45	6,5	60	5,31 ± 0,03 <sup>Be</sup>	6,00 ± 0,08 <sup>Ac</sup>	6,06 ± 0,05 <sup>Ad</sup>

Etapa 1 a 6: simulação das condições do esôfago-estômago; Etapa 7: simulação das condições do duodeno; Etapa 8: simulação das condições do íleo; MAL: micropartículas de alginato liofilizadas; MAQL: micropartículas de alginato revestidas de quitosana com concentração de 0,5% liofilizadas. Os valores expressos são médias de três ensaios independentes ± desvio padrão. <sup>a-e</sup>: letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre a contagem de células viáveis para a cepa livre ou microencapsulada quando testadas em creme de ricota caprino expostos a diferentes etapas da simulação da digestão, de acordo com o teste de Tukey. <sup>A-C</sup>: letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre a contagem de células viáveis para a cepa livre ou microencapsulada quando testada em creme de ricota caprino expostos a mesma etapa da simulação da digestão, de acordo com o teste de Tukey.

## 6.9 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL, RENDIMENTO, PH, ACIDEZ E ATIVIDADE DE ÁGUA DO CREME DE RICOTA CAPRINO

Os valores da composição centesimal, rendimento, pH, acidez e atividade de água do creme de ricota caprino adicionado de *L. acidophilus* La-05 microencapsulado estão representados na Tabela 10. As formulações apresentaram 6,65-7,44 g/L de rendimento, 72,64-77,22 g/100 g de umidade, 9,25-12,06 g/100 g de proteína, 8,44-

10,61 g/100 g de lipídeos, 1,82-2,63 g/100 g de cinzas, 0,96 de Aa e pH de 5,68-5,85. A presença de sinerese não foi observada nas amostras.

A incorporação de *L. acidophilus* La-05 livre ou microencapsulado nas formulações não modificou os valores de atividade de água ( $p \geq 0,05$ ), mas aumentou o rendimento, o teor de umidade e o pH, como também diminuiu o teor de cinzas, proteína e lipídeos ( $p < 0,05$ , exceto para a proteína das amostras contendo células livres). Portanto, o impacto da adição da cultura probiótica foi independente de ser livre ou microencapsulada.

Os resultados sugerem que a incorporação de *L. acidophilus* La-05 contribuiu para aumentar a retenção de água no queijo, resultando em um produto com maior rendimento, pH e teor de umidade e, conseqüentemente, menor teor de cinzas, lipídeos e proteínas. O maior rendimento é um aspecto positivo, considerando o ponto de vista e a lucratividade da indústria de alimentos. O maior teor de umidade pode ter afetado positivamente a textura das amostras, principalmente a maciez, característica desejável em queijos cremosos (BORBA et al., 2013).

O pH mais alto forneceu um ambiente mais favorável para os probióticos sobreviverem durante o armazenamento, uma vez que a viabilidade celular pode ser seriamente afetada em baixos valores de pH (MIRANDA et al., 2019). Além disso, pode ter melhorado a aceitação sensorial, pois os consumidores preferem produtos com menor acidez (MANTOVANI et al., 2020).

Durante o armazenamento, houve aumento nos valores de pH, redução da acidez titulável ( $p < 0,05$ ) e manutenção da Aa ( $p \geq 0,05$ ) em todas as formulações avaliadas. A menor acidez dos queijos pode estar associada à proteólise, que resulta na formação de compostos de natureza básica (MANTOVANI et al., 2020). A adição da cultura probiótica microencapsulada (MAL e MAQL) manteve o teor de umidade ( $p \geq 0,05$ ), por outro lado, as amostras sem adição de probióticos e adicionados de células livres apresentaram perda de umidade ( $p < 0,05$ ) durante o armazenamento. Além disso, as amostras contendo MAL (dia 1 e 7) e MAQL (dia 1) apresentaram maior teor de lipídeos do que as amostras contendo células livres liofilizadas ( $p < 0,05$ ).

Os dados sugerem que a adição de culturas probióticas microencapsuladas promoveu a retenção de água nos produtos durante o armazenamento, o que é desejado, pois a perda de umidade está associada a produtos mais duros. Como

também, indicam que as micropartículas podem ter impedido a interação entre a matriz alimentar e a cepa probiótica, protegendo o queijo contra alterações na composição lipídica e preservando as características dos produtos (BEZERRA et al., 2017 a).

**Tabela 10** - Rendimento, atividade de água, pH, acidez e composição centesimal do creme de ricota caprino durante 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C)

Parâmetros	Dias de armazenamento	Formulações do creme de ricota caprino			
		Controle	Células livres	MAL	MAQL
Rendimento (g/L)	1	6,65 ± 0,04 <sup>B</sup>	7,13 ± 0,01 <sup>A</sup>	7,41 ± 0,28 <sup>A</sup>	7,44 ± 0,32 <sup>A</sup>
	7	2,36 ± 0,04 <sup>Ab</sup>	1,84 ± 0,08 <sup>Ca</sup>	2,16 ± 0,05 <sup>Ba</sup>	1,98 ± 0,04 <sup>Ca</sup>
Cinzas (g/100 g)	1	2,63 ± 0,05 <sup>Aa</sup>	1,82 ± 0,05 <sup>Ba</sup>	1,82 ± 0,09 <sup>Bb</sup>	1,91 ± 0,05 <sup>Ba</sup>
	7	73,41 ± 0,29 <sup>Da</sup>	77,22 ± 0,13 <sup>Aa</sup>	74,37 ± 0,08 <sup>Ca</sup>	76,31 ± 0,25 <sup>Ba</sup>
Umidade (g/100 g)	1	72,64 ± 0,27 <sup>Cb</sup>	76,35 ± 0,15 <sup>Ab</sup>	74,50 ± 0,27 <sup>Ba</sup>	76,34 ± 0,16 <sup>Aa</sup>
	7	0,96 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	0,96 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	0,96 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	0,96 ± 0,00 <sup>Aa</sup>
Aa	1	0,96 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	0,96 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	0,96 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	0,96 ± 0,00 <sup>Aa</sup>
	7	0,96 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	0,96 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	0,96 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	0,96 ± 0,00 <sup>Aa</sup>
pH	1	5,68 ± 0,08 <sup>Bb</sup>	5,79 ± 0,01 <sup>Ab</sup>	5,79 ± 0,01 <sup>Ab</sup>	5,81 ± 0,03 <sup>Ab</sup>
	7	5,77 ± 0,05 <sup>Ba</sup>	5,83 ± 0,04 <sup>Aa</sup>	5,80 ± 0,02 <sup>ABa</sup>	5,85 ± 0,03 <sup>Aa</sup>
Acidez em ácido láctico (g/100 g)	1	0,27 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	0,24 ± 0,02 <sup>ABa</sup>	0,27 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>Ba</sup>
	7	0,26 ± 0,01 <sup>Ab</sup>	0,22 ± 0,00 <sup>Bb</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>ABb</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>Bb</sup>
Proteínas (g/100 g)	1	11,03 ± 0,09 <sup>Ab</sup>	10,20 ± 0,36 <sup>ABa</sup>	9,47 ± 0,32 <sup>Ba</sup>	9,98 ± 0,04 <sup>Ba</sup>
	7	12,06 ± 0,27 <sup>Aa</sup>	10,05 ± 0,22 <sup>Ba</sup>	10,11 ± 0,13 <sup>Ba</sup>	9,25 ± 0,37 <sup>Ba</sup>
Lipídeos (g/100 g)	1	10,61 ± 0,23 <sup>Aa</sup>	8,44 ± 0,10 <sup>Cb</sup>	9,32 ± 0,14 <sup>Ba</sup>	9,75 ± 0,31 <sup>Ba</sup>
	7	9,65 ± 0,07 <sup>Ab</sup>	9,15 ± 0,08 <sup>Ba</sup>	9,44 ± 0,10 <sup>Aa</sup>	8,88 ± 0,09 <sup>Cb</sup>

Controle: creme de ricota caprino sem probióticos adicionados; MAL: micropartículas de alginato liofilizadas; MAQL: micropartículas de alginato revestidas de quitosana com concentração de 0,5% liofilizadas. Os valores expressos são médias de três ensaios independentes ± desvio padrão. <sup>a-b</sup>: letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tempos da mesma amostra durante o armazenamento, de acordo com o teste de Tukey. <sup>A-D</sup>: letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre o mesmo tempo de armazenamento nas diferentes amostras, de acordo com o teste de Tukey.

É interessante mencionar que todas as amostras de creme de ricota apresentaram menos de 10% de lipídios, sendo classificados de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996), como queijo desnatado. Devido ao seu baixo teor de gordura, este produto pode ser adequado para dietas especiais com restrição calórica e lipídica, como obesidade, hipercolesterolemia e doenças cardiovasculares (LORDAN et al., 2018).

#### 6.10 ANÁLISE DE PROTEÓLISE DO CREME DE RICOTA CAPRINO

A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos para a proteólise das amostras de creme de ricota de cabra contendo *L. acidophilus* La-05 microencapsulado durante o armazenamento refrigerado (7 °C). A incorporação de *L. acidophilus* La-05 livre ou microencapsulado (MAL e MAQL) não teve impacto nos valores de IPE ( $p \geq 0,05$ ). O IPE está relacionado com a atividade das proteinases do leite e agentes de coagulação que hidrolisam proteínas, principalmente caseína, em peptídeos de alto peso molecular (SANT'ANA et al., 2013). Neste estudo, o mesmo tipo e quantidade de agente coagulante foi usado para fabricar o queijo ricota, conseqüentemente, perfis semelhantes de polipeptídeos foram produzidos. Considerando os valores de IPP, o creme de ricota caprino adicionado de células livres apresentaram valores superiores ( $p < 0,05$ ) aos da amostra controle (sem adição de probióticos), enquanto os queijos com probióticos microencapsulados (MAL e MAQL) mantiveram os valores semelhantes ao do controle ( $p \geq 0,05$ ).

Os resultados sugerem que a adição de células livres promoveu maior proteólise nas amostras. Provavelmente, as micropartículas forneceram um obstáculo físico entre a cultura probiótica e a proteína. Uma maior proteólise pode ser positiva, pois os produtos podem apresentar maior digestibilidade e aumento da concentração de compostos bioativos (SPERRY et al., 2018). No entanto, a produção desses compostos pode alterar a textura (SANT'ANA et al., 2013) e resultar na formação de peptídeos com sabor amargo (SPERRY et al., 2018). Durante o armazenamento, os valores de IPP permaneceram inalterados ( $p \geq 0,05$ ) em todas as amostras (Tabela 11), provavelmente devido ao curto período de armazenamento.

**Tabela 11** - Proteólise do creme de ricota caprino durante 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C)

Proteólise	Dias de armazenamento	Formulações do creme de ricota caprino			
		Controle	Células livres	MAL	MAQL
IPE (g/100 g)	1	13,29 ± 0,71 <sup>Aa</sup>	14,35 ± 1,26 <sup>Aa</sup>	14,13 ± 1,46 <sup>Aa</sup>	14,31 ± 2,24 <sup>Aa</sup>
	7	7,34 ± 1,64 <sup>Ab</sup>	8,91 ± 1,99 <sup>Aa</sup>	9,04 ± 2,18 <sup>Aa</sup>	9,36 ± 2,81 <sup>Aa</sup>
IPP (g/100 g)	1	9,99 ± 0,78 <sup>Ba</sup>	13,27 ± 1,56 <sup>Aa</sup>	10,21 ± 1,51 <sup>Ba</sup>	11,09 ± 0,29 <sup>Ba</sup>
	7	10,31 ± 0,69 <sup>Ba</sup>	13,47 ± 0,33 <sup>Aa</sup>	11,31 ± 2,26 <sup>Ba</sup>	10,31 ± 1,20 <sup>Ba</sup>

Controle: creme de ricota caprino sem probióticos adicionados; IPE: índice de proteólise em extensão; IPP: índice de proteólise em profundidade; MAL: micropartículas de alginato liofilizadas; MAQL: micropartículas de alginato revestidas de quitosana com concentração de 0,5% liofilizadas. <sup>a-b</sup>: letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tempos da mesma amostra durante o armazenamento, de acordo com o teste de Tukey. <sup>A-B</sup>: letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre o mesmo tempo de armazenamento nas diferentes amostras, de acordo com o teste de Tukey.

## 6.11 ANÁLISE DE TEXTURA E COR INSTRUMENTAL DO CREME DE RICOTA CAPRINO

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos para o perfil de textura e cor das amostras de creme de ricota de cabra adicionados de probióticos microencapsulados durante o armazenamento refrigerado (7 °C). As amostras apresentaram 2,16 - 7,67 N para dureza, 164,51 - 566,11 g/s para adesividade, 0,73-0,89 para elasticidade, 0,30-0,51 para coesividade e 1,07-2,04 N para gomosidade. Portanto, as formulações foram caracterizadas como macias, elásticas e não coesas ou adesivas, apresentando uma cor amarelo claro. De fato, o leite de cabra possui glóbulos de gordura de menor diâmetro e baixas concentrações de  $\alpha$ 1-caseína, resultando em produtos mais macios (GOMES et al., 2013).

A incorporação de *L. acidophilus* La-05 livre ou microencapsulado resultou em menor dureza, gomosidade e elasticidade, além de maior coesividade e adesividade ( $p < 0,05$ ) que a formulação controle. Essas diferenças podem estar relacionadas ao teor de umidade e à presença da cultura probiótica. Os queijos com maior teor de umidade têm uma rede proteica mais fraca que resulta em queijos mais macios

(SANT'ANA et al., 2013). Portanto, a diminuição da dureza e da gomosidade foi um aspecto positivo da adição de probióticos. No entanto, é importante avaliar o impacto do aumento da adesividade. Deve-se observar que a adição da cultura probiótica microencapsulada (MAL e MAQL) resultou em produtos com menor adesividade e gomosidade ( $p < 0,05$ ) do que o produto com células livres, o que é interessante do ponto de vista tecnológico, pois é esperado que os queijos cremosos tenham textura macia e não pegajosa.

Durante o armazenamento, houve diminuição nos valores de adesividade, coesividade e gomosidade em todas as amostras ( $p < 0,05$ ), o que pode estar relacionado ao pH mais alto (Tabela 10), que proporcionou uma menor contração da matriz proteica (PIMENTEL; GARCIA; PRUDENCIO, 2012). O produto com cultura probiótica em MAL manteve os valores de dureza ( $p \geq 0,05$ ), por outro lado observou-se um aumento ( $p < 0,05$ ) nas demais formulações, que foi associado à diminuição do teor de umidade (Tabela 10).

De maneira geral, as amostras de creme de ricota caprino apresentaram os valores de 41,86-68,01 para  $L^*$ , -0,67 - -1,07 para  $a^*$  e 5,27-8,42 para  $b^*$  (Tabela 12). A incorporação de *L. acidophilus* La-05 livre ou microencapsulado resultou em maiores valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  ( $p < 0,05$ ) que o produto controle, sugerindo que as formulações contendo probióticos proporcionaram uma maior intensidade de cor clara, amarela e verde. De fato, culturas probióticas liofilizadas apresentam uma cor amarela (MIRANDA et al., 2019). É importante observar que a utilização da cultura probiótica na forma microencapsulada (MAL) mostrou uma alteração mais acentuada nos parâmetros de cor.

Esses resultados provavelmente estão relacionados com a cor (entre o branco e o amarelo) dos materiais microencapsulantes (alginato de sódio e quitosana) (HOLKEM et al., 2016; KIM et al., 2011). Além disso, a cepa probiótica pode sintetizar nutrientes envolvidos na produção de pigmentos verdes em alimentos, como as vitaminas B2 e B12 (MEIRA et al., 2015). Durante o armazenamento, houve aumento nos valores de  $L^*$  e  $b^*$  e diminuição nos valores de  $a^*$  ( $p < 0,05$ ), sugerindo que os produtos se tornaram mais claros e amarelos.

**Tabela 12** - Perfil de textura e cor do creme de ricota caprino durante 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C)

Parâmetros	Dias de armazenamento	Formulações do creme de ricota caprino			
		Controle	Células livres	MAL	MAQL
<b>Textura</b>					
Dureza (N)	1	3,89 ± 0,58 <sup>Ab</sup>	2,40 ± 0,18 <sup>Bb</sup>	2,16 ± 0,07 <sup>Ba</sup>	2,36 ± 0,11 <sup>Bb</sup>
	7	7,67 ± 0,40 <sup>Aa</sup>	3,49 ± 0,05 <sup>Ba</sup>	2,17 ± 0,13 <sup>Ca</sup>	2,50 ± 0,06 <sup>Ca</sup>
Adesividade (g/s)	1	- 164,51 ± 39,56 <sup>Ca</sup>	- 319,10 ± 17,26 <sup>Aa</sup>	- 238,58 ± 3,79 <sup>Ba</sup>	- 284,34 ± 26,39 <sup>ABa</sup>
	7	- 251,79 ± 6,94 <sup>Cb</sup>	- 509,93 ± 11,00 <sup>Bb</sup>	- 566,11 ± 26,16 <sup>Ab</sup>	- 564,55 ± 2,56 <sup>Ab</sup>
Elasticidade	1	0,81 ± 0,06 <sup>Aa</sup>	0,80 ± 0,01 <sup>Bb</sup>	0,81 ± 0,03 <sup>Bb</sup>	0,80 ± 0,04 <sup>Bb</sup>
	7	0,73 ± 0,15 <sup>Ba</sup>	0,87 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	0,88 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	0,89 ± 0,04 <sup>Aa</sup>
Coesividade	1	0,43 ± 0,04 <sup>Ba</sup>	0,49 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	0,51 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	0,49 ± 0,03 <sup>Aa</sup>
	7	0,30 ± 0,01 <sup>Cb</sup>	0,42 ± 0,02 <sup>Bb</sup>	0,47 ± 0,01 <sup>Ab</sup>	0,47 ± 0,02 <sup>Ab</sup>
Gomosidade (N)	1	1,69 ± 0,16 <sup>Ab</sup>	1,35 ± 0,14 <sup>Bb</sup>	1,07 ± 0,03 <sup>Cb</sup>	1,14 ± 0,05 <sup>Cb</sup>
	7	2,04 ± 0,17 <sup>Aa</sup>	1,55 ± 0,11 <sup>Ba</sup>	1,37 ± 0,00 <sup>Ca</sup>	1,28 ± 0,02 <sup>Ca</sup>
<b>Cor</b>					
L*	1	41,86 ± 0,80 <sup>Db</sup>	48,62 ± 0,60 <sup>Bb</sup>	49,67 ± 0,25 <sup>Ab</sup>	45,22 ± 0,19 <sup>Cb</sup>
	7	59,99 ± 0,07 <sup>Da</sup>	65,18 ± 0,12 <sup>Ca</sup>	66,76 ± 0,21 <sup>Ba</sup>	68,01 ± 0,09 <sup>Aa</sup>
a*	1	-0,67 ± 0,02 <sup>Bb</sup>	-0,70 ± 0,02 <sup>Ab</sup>	-0,71 ± 0,01 <sup>Ab</sup>	-0,69 ± 0,01 <sup>Ab</sup>
	7	-0,81 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	-1,00 ± 0,01 <sup>Ca</sup>	-0,92 ± 0,01 <sup>Ba</sup>	-1,07 ± 0,02 <sup>Da</sup>
b*	1	5,27 ± 0,01 <sup>Cb</sup>	5,38 ± 0,02 <sup>Bb</sup>	5,86 ± 0,06 <sup>Ab</sup>	5,45 ± 0,09 <sup>Bb</sup>
	7	6,48 ± 0,01 <sup>Da</sup>	7,71 ± 0,01 <sup>Ca</sup>	7,81 ± 0,01 <sup>Ba</sup>	8,42 ± 0,03 <sup>Aa</sup>

Controle: creme de ricota caprino sem probióticos adicionados; MAL: micropartículas de alginato liofilizadas; MAQL: micropartículas de alginato revestidas de quitosana com concentração de 0,5% liofilizadas. <sup>a-b</sup>: letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tempos da mesma amostra durante o armazenamento, de acordo com o teste de Tukey. <sup>A-D</sup>: letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre o mesmo tempo de armazenamento nas diferentes amostras, de acordo com o teste de Tukey.

## 6.12 ANÁLISE DO PERFIL DE AÇÚCARES E ÁCIDOS ORGÂNICOS DO CREME DE RICOTA CAPRINO

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos para o perfil de açúcares e ácidos orgânicos das amostras de creme de ricota de cabra adicionados de probióticos microencapsulados durante o armazenamento refrigerado (7 °C). As formulações apresentaram 2,18 - 3,06 g/100 g de lactose, 0,10 - 0,25 g/100 g de galactose, 0,14 - 0,42 g/100 g de glicose, 0,06 - 0,39 g/100 g de ácido láctico e 0,20 - 0,34 g/100 g de ácido acético.

**Tabela 13** - Perfil de açúcares e ácidos orgânicos do creme de ricota caprino durante 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C)

Parâmetros	Dias de armazenamento	Formulações do creme de ricota caprino			
		Controle	Células livres	MAL	MAQL
<b>Açúcares</b>					
Lactose	1	2,93 ± 0,01 <sup>Ab</sup>	2,14 ± 0,01 <sup>Cb</sup>	2,18 ± 0,01 <sup>Cb</sup>	2,63 ± 0,01 <sup>Bb</sup>
	7	3,06 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	2,61 ± 0,01 <sup>Ba</sup>	2,52 ± 0,08 <sup>Ba</sup>	3,10 ± 0,05 <sup>Aa</sup>
Galactose	1	0,13 ± 0,00 <sup>Ca</sup>	0,17 ± 0,00 <sup>Bb</sup>	0,25 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	0,10 ± 0,00 <sup>Db</sup>
	7	0,12 ± 0,00 <sup>Cb</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>Bb</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>Ba</sup>
Glicose	1	0,27 ± 0,01 <sup>Ca</sup>	0,31 ± 0,01 <sup>Ba</sup>	0,42 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>Da</sup>
	7	0,14 ± 0,00 <sup>Cb</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>Bb</sup>	0,32 ± 0,01 <sup>Ab</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>Bb</sup>
<b>Ácidos orgânicos</b>					
Ácido láctico	1	0,36 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	0,16 ± 0,00 <sup>Cb</sup>	0,24 ± 0,00 <sup>Bb</sup>	0,26 ± 0,00 <sup>Bb</sup>
	7	0,06 ± 0,00 <sup>Db</sup>	0,39 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	0,29 ± 0,00 <sup>Ca</sup>	0,34 ± 0,02 <sup>Ba</sup>
Ácido acético	1	0,34 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	0,20 ± 0,00 <sup>Cb</sup>	0,26 ± 0,00 <sup>Ba</sup>	0,25 ± 0,00 <sup>Bb</sup>
	7	0,24 ± 0,00 <sup>Bb</sup>	0,34 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	0,27 ± 0,00 <sup>Ba</sup>	0,34 ± 0,03 <sup>Aa</sup>

Controle: creme de ricota caprino sem probióticos adicionados; MAL: micropartículas de alginato liofilizadas; MAQL: micropartículas de alginato revestidas de quitosana com concentração de 0,5% liofilizadas. <sup>a-b</sup>: letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tempos da mesma amostra durante o armazenamento, de acordo com o teste de Tukey. <sup>A-D</sup>: letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre o mesmo tempo de armazenamento nas diferentes amostras, de acordo com o teste de Tukey.

A incorporação de *L. acidophilus* La-05 livre ou microencapsulado resultou em menor concentração inicial de lactose, ácido láctico e ácido acético ( $p < 0,05$ ), o que está associado ao maior teor de umidade dos produtos (Tabela 10). Entretanto, durante o armazenamento, os produtos com probióticos apresentaram menores concentrações de lactose e maiores concentrações de glicose, galactose, ácido láctico e ácido acético ( $p < 0,05$ ).

A cultura probiótica permanece ativa metabolicamente mesmo em armazenamentos refrigerados, resultando na hidrólise da lactose em seus monossacarídeos (galactose e glicose), na fermentação desses açúcares e na produção de ácidos láctico e acético (PIMENTEL GARCIA; PRUDENCIO, 2012). A maior acidez dos produtos probióticos pode impactar negativamente na aceitação sensorial pelos consumidores (BEZERRA et al., 2017 b). No entanto, a microencapsulação (MAL e MAQL) resultou em produtos com menor teor de ácidos láctico e acético e galactose, além de maior teor de lactose durante o armazenamento ( $p < 0,05$ ) do que as amostras contendo células livres. O efeito foi mais pronunciado para a formulação contendo MAQL ( $p < 0,05$ ).

Esses resultados sugerem que a microencapsulação de *L. acidophilus* La-05 pode ter impedido a cepa probiótica de interagir com a matriz alimentar, hidrolisar a lactose e produzir ácido láctico (MEIRA et al., 2015). O aumento da atividade das células livres no creme de ricota pode ter gerado aminoácidos precursores para a síntese de ácido acético (BARBOSA et al., 2016). A galactose tem sido associada ao aparecimento de sabores indesejáveis no queijo (MUELAS et al., 2018) e o ácido acético a um sabor ácido de vinagre (MIRANDA et al., 2019). Portanto, a menor concentração de galactose e ácido acético nos produtos probióticos microencapsulados é importante do ponto de vista sensorial.

### 6.13 ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO CREME DE RICOTA CAPRINO

A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos para o perfil de ácidos graxos das amostras do creme de ricota de cabra contendo probióticos microencapsulados

durante o armazenamento refrigerado (7 °C). Vinte e oito ácidos graxos foram detectados nas amostras, sendo 15 classificados como saturados (AGS) e 13 como insaturados (AGI). Entre os ácidos graxos insaturados, 7 foram classificados como monoinsaturados (AGMI) e 6 como poli-insaturados (AGPI).

As formulações apresentaram maiores valores de ácidos graxos de cadeia longa, com destaque para os ácidos saturados palmítico (24,46-28,00 g/100 g de lipídeos) e esteárico (11,46-12,41 g/100g de lipídeos) e ácido monoinsaturado oleico (14,34 -19,28 g/100 g de lipídeos). Os ácidos graxos caproico (C6: 0) e caprílico (C8: 0) são responsáveis pelo aroma e sabor típicos dos produtos lácteos de cabra (DE MEDEIROS et al., 2014) e foram encontrados em pequenas quantidades (2-3 g/100 g de gordura), provavelmente devido às baixas concentrações desses compostos no soro de cabra (MEIRA et al., 2015).

As amostras também apresentaram ácidos graxos essenciais como ômega 3 alfa-linolênico, ômega 6 linoleico e gama-linolênico. Sabe-se que os ácidos graxos essenciais promovem benefícios à saúde, como a redução do risco de doenças crônicas (ROMÁN et al., 2019). Os ácidos ômega 9 oleico (C18:1 n9cis), eicosapentaenóico (C20:5) e docosahexaenóico (C22:6) também foram detectados nos queijos. Embora esses ácidos graxos não sejam considerados essenciais, seu consumo está associado a uma diminuição dos níveis de colesterol no sangue, bem como a um menor risco de doenças cardiovasculares (PALOMER et al., 2018; PUNIA et al., 2019).

As amostras contendo *L. acidophilus* La-05 livre e microencapsulado apresentou diminuições no ácido palmítico, com conseqüente diminuição do IT ( $p < 0,05$ ). Um alto consumo de ácido palmítico está relacionado ao aumento dos riscos de dislipidemia, acúmulo de gordura, altos níveis de glicose no sangue e propriedades inflamatórias (SILVA et al., 2020 b). A diminuição do IT está associada a uma menor capacidade de formar coágulos nos vasos sanguíneos (SPERRY et al., 2018). Portanto, a adição de culturas probióticas melhorou o perfil de ácidos graxos dos produtos.

Durante o armazenamento, as amostras contendo probióticos mantiveram o teor dos ácidos graxos ( $p \geq 0,05$ ), enquanto uma diminuição nos AGMI (ácido oleico) e AGI e um aumento no AGS foi observado na amostra controle ( $p < 0,05$ ). O AGMI

pode proteger contra fatores de risco de doenças cardiovasculares e síndrome metabólica (SPERRY et al., 2018). Alterações no perfil lipídico das amostras contendo culturas probióticas podem afetar a qualidade sensorial dos queijos, uma vez que o perfil de ácidos graxos está fortemente associado à produção de compostos aromáticos (BARBOSA et al., 2016).

Em uma visão geral, a forma que a cultura probiótica foi adicionada (livre e microencapsulada) não impactou no perfil de ácidos graxos. A adição de células livres aumentou o teor de ácido oleico e diminuiu o ácido graxo elaídico no final do armazenamento ( $p < 0,05$ ), mas esses compostos são isômeros. O ácido elaídico pode sofrer bio-hidrogenação, sendo convertido em ácido graxo esteárico saturado e transformado em ácido oleico pela ação da enzima  $\Delta$ -9 dessaturase (DE MEDEIROS et al., 2014).

**Tabela 14** - Perfil de ácidos graxos (g/100g) do creme de ricota caprino durante 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C)

Ácidos graxos	Dias de armazenamento	Formulações do creme de ricota caprino			
		Controle	Células livres	MAL	MAQL
<b>Cadeia curta</b>					
Butírico (C4:0)	1	1,26 ± 0,13 <sup>Aa</sup>	1,20 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	1,53 ± 0,42 <sup>Aa</sup>	1,15 ± 0,11 <sup>Aa</sup>
	7	1,06 ± 0,06 <sup>Aa</sup>	1,01 ± 0,37 <sup>Aa</sup>	1,25 ± 0,08 <sup>Aa</sup>	1,40 ± 0,29 <sup>Aa</sup>
Caproico (C6:0)	1	2,08 ± 0,16 <sup>Aa</sup>	2,25 ± 0,08 <sup>Aa</sup>	2,39 ± 0,30 <sup>Aa</sup>	2,07 ± 0,09 <sup>Aa</sup>
	7	2,14 ± 0,13 <sup>Aa</sup>	2,23 ± 0,47 <sup>Aa</sup>	2,40 ± 0,06 <sup>Aa</sup>	2,62 ± 0,40 <sup>Aa</sup>
Caprílico (C8:0)	1	2,70 ± 0,12 <sup>Aa</sup>	2,94 ± 0,07 <sup>Aa</sup>	2,95 ± 0,11 <sup>Aa</sup>	2,89 ± 0,20 <sup>Aa</sup>
	7	2,80 ± 0,13 <sup>Aa</sup>	3,10 ± 0,26 <sup>Aa</sup>	3,10 ± 0,08 <sup>Aa</sup>	3,26 ± 0,25 <sup>Aa</sup>
Cáprico (C10:0)	1	9,39 ± 0,25 <sup>Aa</sup>	9,80 ± 0,16 <sup>Aa</sup>	9,47 ± 0,40 <sup>Aa</sup>	9,59 ± 0,65 <sup>Aa</sup>
	7	9,51 ± 0,32 <sup>Aa</sup>	10,64 ± 0,81 <sup>Aa</sup>	10,05 ± 0,27 <sup>Aa</sup>	10,72 ± 0,71 <sup>Aa</sup>
<b>Cadeia média</b>					
Undecílico (C11:0)	1	0,20 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	0,38 ± 0,09 <sup>Aa</sup>	0,28 ± 0,06 <sup>Aa</sup>	0,27 ± 0,09 <sup>Aa</sup>
	7	0,28 ± 0,08 <sup>Aa</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	0,30 ± 0,07 <sup>Aa</sup>	0,27 ± 0,03 <sup>Aa</sup>
Láurico (C12:0)	1	3,47 ± 0,06 <sup>Aa</sup>	3,65 ± 0,08 <sup>Aa</sup>	3,46 ± 0,06 <sup>Aa</sup>	3,60 ± 0,24 <sup>Aa</sup>

	7	3,44 ± 0,07 <sup>Aa</sup>	3,91 ± 0,18 <sup>Aa</sup>	3,73 ± 0,11 <sup>Aa</sup>	3,85 ± 0,12 <sup>Aa</sup>
Tridecílico (C13:0)	1	0,12 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	0,22 ± 0,16 <sup>Aa</sup>	0,13 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	0,09 ± 0,03 <sup>Aa</sup>
	7	0,16 ± 0,04 <sup>Aa</sup>	0,13 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	0,25 ± 0,10 <sup>Aa</sup>	0,19 ± 0,06 <sup>Aa</sup>
	1	8,60 ± 0,17 <sup>Aa</sup>	8,53 ± 0,05 <sup>Aa</sup>	8,25 ± 0,07 <sup>Aa</sup>	8,47 ± 0,30 <sup>Aa</sup>
Mirístico (C14:0)	7	8,47 ± 0,20 <sup>ABa</sup>	8,99 ± 0,18 <sup>Aa</sup>	8,39 ± 0,05 <sup>Ba</sup>	8,70 ± 0,09 <sup>ABa</sup>
	1	0,27 ± 0,11 <sup>Aa</sup>	0,44 ± 0,12 <sup>Aa</sup>	0,36 ± 0,06 <sup>Aa</sup>	0,30 ± 0,01 <sup>Aa</sup>
Miristoleico (C14:1)	7	0,36 ± 0,07 <sup>Aa</sup>	0,35 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	0,38 ± 0,06 <sup>Aa</sup>	0,36 ± 0,06 <sup>Aa</sup>
	1	0,75 ± 0,08 <sup>Aa</sup>	0,85 ± 0,16 <sup>Aa</sup>	0,72 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	0,73 ± 0,03 <sup>Aa</sup>
Pentadecílico (C15:0)	7	0,76 ± 0,04 <sup>Aa</sup>	0,76 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	0,81 ± 0,16 <sup>Aa</sup>	0,73 ± 0,08 <sup>Aa</sup>
	1	0,33 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	0,44 ± 0,09 <sup>Aa</sup>	0,31 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	0,25 ± 0,17 <sup>Aa</sup>
Pentadecenoico (C15:1)	7	0,41 ± 0,18 <sup>Aa</sup>	0,32 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	0,36 ± 0,11 <sup>Aa</sup>	0,31 ± 0,08 <sup>Aa</sup>
	<b>Cadeia longa</b>				
Palmítico (C16:0)	1	26,21 ± 0,32 <sup>Aa</sup>	25,80 ± 0,06 <sup>Aa</sup>	25,48 ± 0,92 <sup>Aa</sup>	25,33 ± 0,16 <sup>Aa</sup>
	7	28,00 ± 0,66 <sup>Aa</sup>	25,46 ± 0,72 <sup>Ba</sup>	24,46 ± 0,44 <sup>Ba</sup>	24,89 ± 0,53 <sup>Ba</sup>
Palmitoleico (C16:1) ω7	1	1,12 ± 0,10 <sup>Aa</sup>	1,19 ± 0,16 <sup>Aa</sup>	1,25 ± 0,16 <sup>Aa</sup>	1,03 ± 0,25 <sup>Aa</sup>
	7	1,36 ± 0,44 <sup>Aa</sup>	1,03 ± 0,14 <sup>Ab</sup>	1,20 ± 0,05 <sup>Aa</sup>	0,94 ± 0,03 <sup>Aa</sup>
Margárico (C17:0)	1	0,64 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	0,70 ± 0,08 <sup>Aa</sup>	0,80 ± 0,20 <sup>Aa</sup>	0,81 ± 0,18 <sup>Aa</sup>
	7	0,70 ± 0,06 <sup>Aa</sup>	0,66 ± 0,05 <sup>Aa</sup>	0,91 ± 0,10 <sup>Aa</sup>	0,64 ± 0,05 <sup>Aa</sup>
Esteárico (C18:0)	1	12,41 ± 0,11 <sup>Aa</sup>	12,13 ± 0,07 <sup>Aa</sup>	12,04 ± 0,42 <sup>Aa</sup>	12,37 ± 0,34 <sup>Aa</sup>
	7	12,13 ± 1,46 <sup>Aa</sup>	11,46 ± 0,67 <sup>Aa</sup>	12,03 ± 0,07 <sup>Aa</sup>	11,74 ± 0,78 <sup>Aa</sup>
Eláidico (C18:1 n9trans) ω9	1	5,49 ± 0,05 <sup>Aa</sup>	4,91 ± 0,74 <sup>Aa</sup>	5,08 ± 0,16 <sup>Aa</sup>	5,49 ± 0,08 <sup>Aa</sup>
	7	4,67 ± 0,35 <sup>Aa</sup>	0,80 ± 0,40 <sup>Bb</sup>	5,42 ± 0,17 <sup>Aa</sup>	5,05 ± 0,42 <sup>Aa</sup>
Oleico (C18:1 n9cis) ω9	1	15,26 ± 0,04 <sup>Aa</sup>	14,35 ± 1,01 <sup>Ab</sup>	14,85 ± 0,42 <sup>Aa</sup>	15,02 ± 0,11 <sup>Aa</sup>
	7	14,34 ± 0,28 <sup>Bb</sup>	19,28 ± 0,22 <sup>Aa</sup>	14,40 ± 0,19 <sup>Ba</sup>	14,43 ± 0,97 <sup>Ba</sup>
Linolelaídico (C18:2 n6trans) ω6	1	0,32 ± 0,11 <sup>Aa</sup>	0,12 ± 0,14 <sup>Aa</sup>	0,10 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	0,42 ± 0,43 <sup>Aa</sup>
	7	0,16 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	0,36 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	0,25 ± 0,14 <sup>Aa</sup>	0,17 ± 0,03 <sup>Aa</sup>

Linoleico (C18:2 n6cis) ω6	1	5,31 ± 0,23 <sup>Aa</sup>	5,55 ± 0,26 <sup>Aa</sup>	5,32 ± 0,04 <sup>Aa</sup>	5,57 ± 0,57 <sup>Aa</sup>
	7	5,09 ± 0,05 <sup>Aa</sup>	5,51 ± 0,19 <sup>Aa</sup>	5,39 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	5,15 ± 0,25 <sup>Aa</sup>
Araquídico (C20:0)	1	0,01 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,24 ± 0,04 <sup>Aa</sup>	0,11 ± 0,13 <sup>A</sup>	0,18 ± 0,20 <sup>Aa</sup>
	7	nd	0,17 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	nd	0,38 ± 0,14 <sup>Aa</sup>
Gama-Linolênico (C18:3 n6cis) ω6	1	0,13 ± 0,05 <sup>Aa</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	0,13 ± 0,03 <sup>A</sup>	0,18 ± 0,08 <sup>Aa</sup>
	7	0,12 ± 0,17 <sup>Aa</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	nd	0,18 ± 0,10 <sup>Aa</sup>
Gondoico (C20:1 n11cis) ω9	1	1,04 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	0,97 ± 0,11 <sup>Aa</sup>	0,99 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	0,98 ± 0,09 <sup>Aa</sup>
	7	0,95 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	0,99 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	1,01 ± 0,10 <sup>Aa</sup>	1,01 ± 0,08 <sup>Aa</sup>
Alfa-Linolênico (C18:3 n9cis) ω3	1	0,05 ± 0,06 <sup>Aa</sup>	0,06 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,15 ± 0,05 <sup>A</sup>
	7	0,10 ± 0,10 <sup>Aa</sup>	0,08 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	nd	nd
Heneicosílico (C21:0)	1	0,16 ± 0,11 <sup>Aa</sup>	0,20 ± 0,09 <sup>Aa</sup>	nd	nd
	7	0,29 ± 0,07 <sup>Aa</sup>	0,14 ± 0,06 <sup>Aa</sup>	nd	nd
Beênico (C22:0)	1	0,53 ± 0,08 <sup>Aa</sup>	0,44 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	0,99 ± 0,83 <sup>Aa</sup>	0,65 ± 0,22 <sup>Aa</sup>
	7	0,69 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	0,38 ± 0,13 <sup>Aa</sup>	1,00 ± 0,37 <sup>Aa</sup>	0,50 ± 0,07 <sup>Aa</sup>
Erúcico (C22:1n9) ω9	1	0,24 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	0,33 ± 0,06 <sup>Aa</sup>	0,23 ± 0,05 <sup>Aa</sup>	0,33 ± 0,16 <sup>Aa</sup>
	7	0,26 ± 0,00 <sup>Aa</sup>	0,27 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	0,46 ± 0,30 <sup>Aa</sup>	0,20 ± 0,08 <sup>Aa</sup>
Eicosapentaenoico (C20:5)	1	1,22 ± 0,10 <sup>Aa</sup>	1,54 ± 0,44 <sup>Aa</sup>	1,78 ± 0,83 <sup>Aa</sup>	1,48 ± 0,23 <sup>Aa</sup>
	7	1,16 ± 0,18 <sup>Aa</sup>	0,97 ± 0,12 <sup>Aa</sup>	1,64 ± 0,63 <sup>Aa</sup>	1,18 ± 0,16 <sup>Aa</sup>
Docosaheptaenoico (C22:6)	1	0,62 ± 0,12 <sup>Aa</sup>	0,55 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	0,92 ± 0,44 <sup>Aa</sup>	0,52 ± 0,13 <sup>Aa</sup>
	7	0,64 ± 0,08 <sup>Aa</sup>	0,48 ± 0,20 <sup>Aa</sup>	0,75 ± 0,25 <sup>Aa</sup>	1,07 ± 0,90 <sup>Aa</sup>
AGS	1	68,41 ± 0,10 <sup>Ab</sup>	69,15 ± 0,85 <sup>Aa</sup>	68,63 ± 1,90 <sup>Aa</sup>	68,24 ± 1,09 <sup>Aa</sup>
	7	70,19 ± 0,34 <sup>Aa</sup>	69,20 ± 0,63 <sup>Aa</sup>	68,69 ± 0,11 <sup>Aa</sup>	69,93 ± 0,61 <sup>Aa</sup>
AGI	1	31,43 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	30,65 ± 0,94 <sup>Aa</sup>	31,36 ± 1,90 <sup>Aa</sup>	31,76 ± 1,09 <sup>Aa</sup>
	7	29,52 ± 0,26 <sup>Ab</sup>	30,64 ± 0,57 <sup>Aa</sup>	31,30 ± 0,11 <sup>Aa</sup>	30,06 ± 0,61 <sup>Aa</sup>
AGMI	1	23,77 ± 0,25 <sup>Aa</sup>	22,64 ± 1,76 <sup>Aa</sup>	23,08 ± 0,63 <sup>Aa</sup>	23,42 ± 0,07 <sup>Aa</sup>
	7	22,24 ± 0,20 <sup>Ab</sup>	23,06 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	23,25 ± 0,63 <sup>Aa</sup>	22,31 ± 1,56 <sup>Aa</sup>

AGPI	1	7,65 ± 0,22 <sup>Aa</sup>	8,00 ± 0,83 <sup>Aa</sup>	8,28 ± 1,27 <sup>Aa</sup>	8,34 ± 1,02 <sup>Aa</sup>
	7	7,28 ± 0,47 <sup>Aa</sup>	7,58 ± 0,55 <sup>Aa</sup>	8,05 ± 0,73 <sup>Aa</sup>	7,75 ± 0,94 <sup>Aa</sup>
IA	1	2,04 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	2,08 ± 0,06 <sup>Aa</sup>	1,98 ± 0,15 <sup>Aa</sup>	1,98 ± 0,11 <sup>Aa</sup>
	7	2,21 ± 0,07 <sup>Aa</sup>	2,14 ± 0,05 <sup>Aa</sup>	1,98 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	2,12 ± 0,04 <sup>Aa</sup>
IT	1	3,22 ± 0,06 <sup>Aa</sup>	3,25 ± 0,16 <sup>Aa</sup>	3,21 ± 0,17 <sup>Aa</sup>	3,09 ± 0,11 <sup>Aa</sup>
	7	3,48 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	3,16 ± 0,05 <sup>Ba</sup>	3,15 ± 0,05 <sup>Ba</sup>	3,31 ± 0,12 <sup>ABa</sup>
DFA	1	43,85 ± 0,08 <sup>Aa</sup>	42,78 ± 1,00 <sup>Aa</sup>	43,40 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	44,13 ± 0,03 <sup>Aa</sup>
	7	41,66 ± 1,72 <sup>Aa</sup>	42,50 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	43,34 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	41,81 ± 0,03 <sup>Aa</sup>
HSFA	1	38,29 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	40,00 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	37,20 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	41,52 ± 0,03 <sup>Aa</sup>
	7	39,85 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	40,55 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	36,59 ± 0,03 <sup>Ba</sup>	39,25 ± 0,03 <sup>ABa</sup>

Controle: creme de ricota caprino sem probióticos adicionados; MAL: micropartículas de alginato liofilizadas; MAQL: micropartículas de alginato revestidas de quitosana com concentração de 0,5% liofilizadas; AGS: ácidos graxos saturados; AGI: ácidos graxos insaturados; AGMI: ácidos graxos monoinsaturados; AGPI: ácidos graxos poli-insaturados; Índice de aterogenicidade (IA) = (C12:0 + (4 x C14:0) + C16:0)/(ΣAGMI + ΣAGPI (n-6) e (n-3)); Índice trombogênico (IT) = (C14:0 + C16:0 + C18:0)/[0,5 x ΣAGMI + 0,5 x ΣAGPI(n-6) + 3 x ΣAGPI(n-3) + (n-3)/(n-6)]; Ácidos graxos desejáveis (DFA) = AGMI + AGPI + C18:0; Índice de ácidos graxos saturados hipercolesterolêmicos (HSFA) = C12:0 + C14:0 + C16:0; nd: não detectado. <sup>a-b</sup>: letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença (p < 0,05) entre os diferentes tempos da mesma amostra durante o armazenamento, de acordo com o teste de Tukey. <sup>A-B</sup>: letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença (p < 0,05) entre o mesmo tempo de armazenamento nas diferentes amostras, de acordo com o teste de Tukey.

#### 6.14 ANÁLISE DO PERFIL DE VOLÁTEIS DO CREME DE RICOTA CAPRINO

A Tabela 15 apresenta o perfil volátil do creme de ricota de cabra adicionado de probiótico microencapsulado durante armazenamento refrigerado (7 °C). Queijos frescos geralmente possuem poucos voláteis em sua composição; no entanto, cinquenta compostos foram detectados nos cremes de ricota: 8 ácidos carboxílicos, 7 álcoois, 8 aldeídos, 6 cetonas, 3 ésteres, 9 hidrocarbonetos e 9 terpenos.

Considerando os ácidos carboxílicos, a incorporação de *L. acidophilus* La-05 livre ou microencapsulado resultou em maiores concentrações de ácido hexanoico, ácido tetradecanoico, ácido octadecenoico e ácido octadecanoico, além de menores concentrações de ácido octanoico (p < 0,05). Esses achados podem estar

relacionados à produção de ácidos graxos de cadeia curta através da hidrólise de triglicerídeos por bactérias probióticas (PICON et al., 2019).

As concentrações da maioria dos ácidos carboxílicos foram mais pronunciadas nas amostras contendo células livres, sugerindo que nessa forma, a cultura probiótica estava mais ativa. Além disso, durante o armazenamento, as concentrações de ácidos hexanoico e octanoico aumentaram nesta formulação, enquanto uma diminuição abrupta foi observada nos outros ácidos carboxílicos ( $p < 0,05$ ). Os ácidos caproico (hexanoico) e caprílico (octanoico) contribuem fortemente para o aroma e sabor típicos dos laticínios de cabra, estando associados a odores rançosos (BEZERRA et al., 2017 a; RANADHEERA et al., 2019). Portanto, a menor concentração desses compostos encontrada nos queijos contendo probióticos microencapsulados ( $p < 0,05$ ; dia 7) em comparação com os queijos contendo células livres pode aumentar a aceitação sensorial dos produtos.

Considerando os álcoois e aldeídos, a incorporação de *L. acidophilus* La-05 livre ou microencapsulado resultou no desaparecimento do composto feniletil e na redução da concentração de undecanal ( $p < 0,05$ ), associados ao aroma floral (RANADHEERA et al., 2019). Os queijos contendo probióticos microencapsulados apresentaram maior concentração de nonanol, mentol, butiloctanol, tetradecanol, nonanal e benzaldeído ( $p < 0,05$ ) do que a formulação com células livres. Esses compostos podem fornecer aromas florais, frutados, doces e alcoólicos (MUELAS et al., 2018; RANADHEERA et al., 2019; SANT'ANA et al., 2019). A amostra contendo células livres apresentou maior concentração de octanal (associado aos aromas de gordura e herbal) ao final do período de armazenamento (RANADHEERA et al., 2019).

Considerando as cetonas e os ésteres, a incorporação de *L. acidophilus* La-05 livre ou microencapsulado resultou no desaparecimento dos compostos succinato de etila e decanoato de etila, além de reduções nas concentrações de p-mentona ( $p < 0,05$ , associados à aromas frutados) (RANADHEERA et al., 2019). As amostras adicionadas de culturas probióticas microencapsuladas apresentaram uma maior concentração de 2-heptanona e octanoato de etila ( $p < 0,05$ ) do que a formulação com células livres, que podem fornecer aromas frutados, picantes e de canela aos queijos (RANADHEERA et al., 2019). É importante mencionar que a 2-heptanona e o octanoato de etila são derivados dos ácidos hexanoico e octanoico, portanto, sua

maior concentração contribui para uma menor percepção do aroma e sabor "caprino" (BATTELLI et al., 2019). A amostra com células livres apresentou maior concentração de acetofenona e 2-pentadecanona ( $p < 0,05$ ), sendo esta última uma metil cetona produzida a partir da lipólise de ácidos graxos pela beta oxidação (BEZERRA et al., 2017 a).

Considerando os hidrocarbonetos e os terpenos, a incorporação de *L. acidophilus* La-05 livre ou microencapsulado resultou no aumento de 2,6,11-trimetil dodecano e hexadecano e em reduções nas concentrações de limoneno e 1-dodeceno ( $p < 0,05$ ). O limoneno está associado a notas doces e cítricas (MIRANDA et al., 2019). Os queijos contendo culturas probióticas microencapsuladas apresentaram maior concentração de tetradecano ( $p < 0,05$ ) do que a amostra com células livres, que por sua vez apresentou maior concentração de 4-metil decano e pentadecano ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 15** - Perfil de voláteis do creme de ricota caprino durante 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C)

Classes e compostos	Dias de armazenamento	Formulações do creme de ricota caprino					
		IRL	IRC	Control e	Células livres	MAL	MAQL
<b>Ácidos carboxílicos</b>							
Ácido hexanoico	1			3,28 <sup>Db</sup>	7,10 <sup>Cb</sup>	8,55 <sup>Aa</sup>	7,54 <sup>Ba</sup>
	7	990	991	5,64 <sup>Ca</sup>	8,92 <sup>Aa</sup>	3,64 <sup>Db</sup>	6,27 <sup>Bb</sup>
Ácido octanoico	1	118	118	4,63 <sup>A</sup>	0,54 <sup>Cb</sup>	3,19 <sup>Ba</sup>	nd
	7	0	2	nd	6,05 <sup>Aa</sup>	2,78 <sup>Bb</sup>	nd
Ácido decanoico	1	137	137	nd	nd	nd	0,45 <sup>b</sup>
	7	3	3	nd	nd	nd	0,53 <sup>a</sup>
Ácido tetradecanoico	1	176	175	0,05 <sup>Ca</sup>	0,93 <sup>Aa</sup>	0,91 <sup>Aa</sup>	0,11 <sup>Bb</sup>
	7	8	9	0,08 <sup>Da</sup>	0,17 <sup>Cb</sup>	0,34 <sup>Ab</sup>	0,27 <sup>Ba</sup>
Ácido hexadecanoico	1	195	195	2,26 <sup>Ca</sup>	8,72 <sup>Aa</sup>	3,37 <sup>Ba</sup>	1,77 <sup>Da</sup>
	7	9	8	1,21 <sup>BCb</sup>	1,26 <sup>Bb</sup>	1,71 <sup>Ab</sup>	1,17 <sup>Cb</sup>
Ácido (Z)-11-octadecenoico	1	213	214	3,19 <sup>Ca</sup>	9,86 <sup>Aa</sup>	3,51 <sup>Ba</sup>	2,15 <sup>Da</sup>
	7	9	0	0,69 <sup>Bb</sup>	0,67 <sup>Bb</sup>	1,01 <sup>Ab</sup>	0,40 <sup>Cb</sup>
Ácido cis-13-octadecenoico	1	217	217	2,18 <sup>Ba</sup>	3,05 <sup>Aa</sup>	1,20 <sup>Ca</sup>	1,03 <sup>Da</sup>
	7	0	1	0,77 <sup>Bb</sup>	0,59 <sup>Cb</sup>	1,04 <sup>Ab</sup>	0,35 <sup>Db</sup>
Ácido octadecanoico	1	217	217	1,13 <sup>Da</sup>	3,35 <sup>Aa</sup>	1,52 <sup>Ba</sup>	1,20 <sup>Ca</sup>
	7	2	4	0,44 <sup>Bb</sup>	0,36 <sup>Cb</sup>	0,58 <sup>Ab</sup>	0,41 <sup>BCb</sup>
<b>Álcoois</b>							
1-Octanol	1	107	107	0,70 <sup>Bb</sup>	0,60 <sup>Cb</sup>	0,72 <sup>Bb</sup>	0,86 <sup>Ab</sup>
	7	0	5	4,11 <sup>Ca</sup>	0,93 <sup>Da</sup>	7,88 <sup>Aa</sup>	6,20 <sup>Ba</sup>

Feniletil	1	111	111	0,44 <sup>a</sup>	nd	nd	nd
	7	6	4	0,11 <sup>b</sup>	nd	nd	nd
1-Nonanol	1	117	117	9,21 <sup>Db</sup>	14,37 <sup>C</sup> <sub>a</sub>	17,80 <sup>B</sup> <sub>a</sub>	19,98 <sup>A</sup> <sub>a</sub>
	7	3	3	14,92 <sup>Aa</sup>	13,34 <sup>C</sup> <sub>b</sub>	4,99 <sup>Db</sup>	14,79 <sup>B</sup> <sub>b</sub>
Mentol	1	117	117	0,51 <sup>Cb</sup>	0,43 <sup>Db</sup>	1,27 <sup>Bb</sup>	1,66 <sup>Ab</sup>
	7	5	3	3,31 <sup>Aa</sup>	0,53 <sup>Da</sup>	1,71 <sup>Ca</sup>	2,86 <sup>Ba</sup>
2-Butiloctanol	1	127	128	2,84 <sup>Bb</sup>	1,83 <sup>Db</sup>	3,71 <sup>Ab</sup>	2,48 <sup>Cb</sup>
	7	7	9	4,31 <sup>Da</sup>	4,91 <sup>Ca</sup>	10,15 <sup>A</sup> <sub>a</sub>	7,27 <sup>Ba</sup>
Dodecanol	1	147	147	2,18 <sup>Ca</sup>	3,05 <sup>Ba</sup>	1,20 <sup>Da</sup>	4,09 <sup>Aa</sup>
	7	4	4	0,77 <sup>Bb</sup>	0,59 <sup>Cb</sup>	1,04 <sup>Ab</sup>	0,36 <sup>Db</sup>
Tetradecanol	1	167	167	3,28 <sup>Db</sup>	7,10 <sup>Cb</sup>	8,55 <sup>Aa</sup>	7,54 <sup>Ba</sup>
	7	9	7	5,64 <sup>Ca</sup>	8,92 <sup>Aa</sup>	3,64 <sup>Db</sup>	6,27 <sup>Bb</sup>
<b>Aldeídos</b>							
Benzaldeído	1			nd	0,67 <sup>Ba</sup>	0,37 <sup>Cb</sup>	1,17 <sup>Ab</sup>
	7	962	968	nd	0,41 <sup>Cb</sup>	1,76 <sup>Ba</sup>	3,24 <sup>Aa</sup>
Octanal	1	100	100	2,06	nd	nd	nd
	7	3	4	nd	16,20	nd	nd
Nonanal	1	110	110	1,66 <sup>Cb</sup>	1,56 <sup>Db</sup>	2,61 <sup>Ab</sup>	2,32 <sup>Bb</sup>
	7	4	5	3,15 <sup>Ca</sup>	1,79 <sup>Da</sup>	3,46 <sup>Aa</sup>	3,32 <sup>Ba</sup>
Decanal	1	120	120	0,35 <sup>Ab</sup>	0,16 <sup>Bb</sup>	0,37 <sup>Aa</sup>	0,18 <sup>Bb</sup>
	7	6	5	0,51 <sup>Aa</sup>	0,28 <sup>Ba</sup>	0,27 <sup>Bb</sup>	0,53 <sup>Aa</sup>
2,5-Dimetilbenzaldeído	1			0,18 <sup>Ba</sup>	5,62 <sup>Aa</sup>	nd	nd
	7	120	121	0,14 <sup>Ba</sup>	0,29 <sup>Ab</sup>	nd	nd
Undecanal	1	130	130	0,90 <sup>Aa</sup>	0,23 <sup>Cb</sup>	0,52 <sup>Bb</sup>	0,21 <sup>Cb</sup>
	7	7	7	0,37 <sup>Db</sup>	0,92 <sup>Ca</sup>	2,06 <sup>Aa</sup>	1,17 <sup>Ba</sup>
Dodecanal	1	140	140	0,18 <sup>Aa</sup>	0,06 <sup>Ba</sup>	0,21 <sup>Aa</sup>	0,10 <sup>Ba</sup>
	7	9	9	0,06 <sup>Bb</sup>	0,07 <sup>Ba</sup>	0,13 <sup>Ab</sup>	0,06 <sup>Ba</sup>
Hexadecanal	1	181	181	0,25 <sup>Ba</sup>	0,27 <sup>ABa</sup>	0,32 <sup>Aa</sup>	0,04 <sup>Cb</sup>
	7	7	6	0,05 <sup>Bb</sup>	0,07 <sup>ABb</sup>	0,05 <sup>Bb</sup>	0,11 <sup>Aa</sup>
<b>Cetonas</b>							
2-Heptanona	1			0,06 <sup>Cb</sup>	0,67 <sup>Aa</sup>	0,09 <sup>Cb</sup>	0,37 <sup>Bb</sup>
	7	891	889	0,16 <sup>Ca</sup>	0,07 <sup>Db</sup>	0,27 <sup>Ba</sup>	0,72 <sup>Aa</sup>
Acetofenona	1	106	106	nd	0,45 <sup>Aa</sup>	nd	0,50 <sup>Ab</sup>
	7	5	6	nd	0,27 <sup>Bb</sup>	nd	1,03 <sup>Aa</sup>
2-Nonanona	1	109	109	nd	nd	nd	0,18 <sup>b</sup>
	7	2	3	nd	nd	nd	0,52 <sup>a</sup>
p-Mentona	1	115	115	0,57 <sup>Ab</sup>	0,26 <sup>Cb</sup>	0,36 <sup>Bb</sup>	0,28 <sup>Cb</sup>
	7	4	3	1,45 <sup>Ca</sup>	0,38 <sup>Da</sup>	1,90 <sup>Aa</sup>	1,62 <sup>Ba</sup>
2-Undecanona	1	129	129	0,57 <sup>Aa</sup>	0,25 <sup>Ca</sup>	0,59 <sup>Aa</sup>	0,33 <sup>Ba</sup>
	7	4	4	0,43 <sup>Ab</sup>	0,16 <sup>Cb</sup>	0,24 <sup>Bb</sup>	0,38 <sup>Aa</sup>
2-Pentadecanona	1	169	169	2,06	nd	nd	nd
	7	8	9	nd	16,20	nd	nd
<b>Ésteres</b>							
Succinato de etila	1	118	119	1,46 <sup>b</sup>	nd	nd	nd
	7	2	1	1,64 <sup>a</sup>	nd	nd	nd

Octanoato de etila	1	119	119	2,68 <sup>Cb</sup>	2,15 <sup>Db</sup>	5,10 <sup>Ab</sup>	4,24 <sup>Bb</sup>
	7	6	8	13,45 <sup>Aa</sup>	4,75 <sup>Da</sup>	8,60 <sup>Ca</sup>	9,10 <sup>Ba</sup>
Decanoato de etila	1	139	139	0,49 <sup>a</sup>	nd	nd	nd
	7	3	7	0,21 <sup>b</sup>	nd	nd	nd
<b>Hidrocarbonetos</b>							
4-metil Decano	1	106	106	0,89 <sup>Ba</sup>	0,42 <sup>Cb</sup>	1,57 <sup>Aa</sup>	0,23 <sup>Da</sup>
	7	0	0	0,25 <sup>Bb</sup>	0,62 <sup>Aa</sup>	0,21 <sup>Bb</sup>	0,23 <sup>Ba</sup>
2,6,11-Trimetildodecano	1	127	128	0,94 <sup>Ca</sup>	15,79 <sup>Aa</sup>	1,76 <sup>Ba</sup>	1,78 <sup>Ba</sup>
	7	5	0	0,40 <sup>Cb</sup>	2,21 <sup>Ab</sup>	0,51 <sup>Bb</sup>	0,47 <sup>Bb</sup>
4,6-Dimetildodecano	1	132	132	0,88 <sup>Aa</sup>	0,27 <sup>Cb</sup>	0,49 <sup>Ba</sup>	0,16 <sup>Da</sup>
	7	5	6	0,25 <sup>Cb</sup>	0,44 <sup>Ba</sup>	0,53 <sup>Aa</sup>	0,15 <sup>Da</sup>
Tetradecano	1	140	139	0,05 <sup>Ca</sup>	0,93 <sup>Aa</sup>	0,91 <sup>Aa</sup>	0,44 <sup>Ba</sup>
	7	0	9	0,08 <sup>Da</sup>	0,17 <sup>Cb</sup>	0,34 <sup>Ab</sup>	0,28 <sup>Bb</sup>
1-Clorododecano	1	146	147	3,19 <sup>Da</sup>	9,86 <sup>Aa</sup>	3,51 <sup>Ca</sup>	8,50 <sup>Ba</sup>
	7	9	0	0,69 <sup>Bb</sup>	0,67 <sup>Bb</sup>	1,01 <sup>Ab</sup>	0,41 <sup>Cb</sup>
Pentadecano	1	150	149	1,13 <sup>Da</sup>	3,35 <sup>Ba</sup>	1,52 <sup>Ca</sup>	4,76 <sup>Aa</sup>
	7	0	6	0,44 <sup>Cb</sup>	3,36 <sup>Aa</sup>	0,58 <sup>Bb</sup>	0,42 <sup>Cb</sup>
Hexadecano	1	160	159	nd	0,67 <sup>Ba</sup>	0,37 <sup>Cb</sup>	1,17 <sup>Ab</sup>
	7	0	9	nd	0,41 <sup>Cb</sup>	1,76 <sup>Ba</sup>	3,24 <sup>Aa</sup>
5-Fenildodecano	1	173	171	nd	1,23 <sup>A</sup>	nd	0,15 <sup>B</sup>
	7	0	0	nd	nd	nd	nd
Octadecano	1	180	179	0,18 <sup>Aa</sup>	0,06 <sup>Ba</sup>	0,21 <sup>Aa</sup>	0,03 <sup>Ba</sup>
	7	0	9	0,06 <sup>Bb</sup>	0,07 <sup>Ba</sup>	0,13 <sup>Ab</sup>	0,06 <sup>Ba</sup>
<b>Terpenos</b>							
α-Tujeno	1			0,07	nd	nd	nd
	7	929	932	nd	nd	nd	nd
o-Cimeno	1	102	102	nd	1,23 <sup>A</sup>	nd	0,15 <sup>B</sup>
	7	2	3	nd	nd	nd	nd
Limoneno	1	103	102	11,62 <sup>Aa</sup>	0,23 <sup>C</sup>	5,75 <sup>Ba</sup>	nd
	7	1	7	0,33 <sup>Ab</sup>	nd	0,21 <sup>Bb</sup>	nd
1-Dodeceno	1	119	119	2,39 <sup>Aa</sup>	0,72 <sup>Cb</sup>	1,17 <sup>Ba</sup>	0,58 <sup>Da</sup>
	7	0	2	0,58 <sup>Bb</sup>	2,90 <sup>Aa</sup>	0,48 <sup>Cb</sup>	0,55 <sup>Ba</sup>
α-Copaeno	1	137	137	0,71 <sup>a</sup>	nd	nd	nd
	7	6	8	0,31 <sup>b</sup>	nd	nd	nd
Cariofileno	1	141	142	0,25 <sup>Ba</sup>	0,27 <sup>ABa</sup>	0,32 <sup>Aa</sup>	0,17 <sup>Ca</sup>
	7	9	2	0,05 <sup>Bb</sup>	0,07 <sup>ABb</sup>	0,05 <sup>Bb</sup>	0,12 <sup>Ab</sup>
Humuleno	1	145	145	2,26 <sup>Da</sup>	8,72 <sup>Aa</sup>	3,37 <sup>Ca</sup>	7,00 <sup>Ba</sup>
	7	4	8	1,21 <sup>BCb</sup>	1,26 <sup>Bb</sup>	1,71 <sup>Ab</sup>	1,20 <sup>Cb</sup>
δ-Cadineno	1	152	152	0,06 <sup>Cb</sup>	0,67 <sup>Aa</sup>	0,09 <sup>Cb</sup>	0,37 <sup>Bb</sup>
	7	4	6	0,16 <sup>Ca</sup>	0,07 <sup>Db</sup>	0,27 <sup>Ba</sup>	0,72 <sup>Aa</sup>
3,7(11)-Selinadieno	1	154	154	0,07	nd	nd	nd
	7	2	0	nd	nd	nd	nd

Controle: creme de ricota caprino sem probióticos adicionados; MAL: micropartículas de alginato liofilizadas; MAQL: micropartículas de alginato revestidas de quitosana com concentração de 0,5% liofilizadas; IRL: índice de retenção da literatura; IRC: índice de retenção calculado; nd: não detectado. <sup>a-b</sup>: letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença (p < 0,05) entre os diferentes tempos da mesma amostra durante o armazenamento, de acordo com o teste de Tukey. <sup>A-D</sup>: letras maiúsculas diferentes na mesma

linha indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre o mesmo tempo de armazenamento nas diferentes amostras, de acordo com o teste de Tukey.

## 6.15 ANÁLISE SENSORIAL DO CREME DE RICOTA CAPRINO

O teste de aceitação do consumidor e a intenção de compra do creme de ricota caprino são apresentados na Tabela 16. As amostras receberam pontuações entre 6,52 e 7,73 em uma escala de 9 pontos, o que indica que os consumidores gostaram dos produtos moderadamente. A intenção de compra recebeu pontuação entre 3 e 4 em uma escala de 5 pontos, indicando que os consumidores provavelmente comprariam o creme de ricota caprino.

A incorporação de *L. acidophilus* La-05 livre ou microencapsulado não alterou a aceitação sensorial e a intenção de compra dos queijos ( $p \geq 0,05$ ). Além disso, não houve diferença entre as formulações no teste de classificação de preferências ( $p \geq 0,05$ ). Os dados indicaram que, embora a adição de culturas probióticas tenha resultado em alterações físico-químicas (Tabela 10), parâmetros de textura e cor (Tabela 12), perfil de ácidos graxos (Tabela 14) e perfil volátil (Tabela 15) dos produtos, eles não tiveram impacto na aceitação do consumidor.

**Tabela 16** - Aceitação sensorial e intenção de compra do creme de ricota caprino após 7 dias de armazenamento refrigerado (7 °C)

Atributos	Formulações do creme de ricota caprino			
	Controle	Células livres	MAL	MAQL
<b>Teste de aceitação</b>				
Aparência	6,96 ± 1,50 <sup>a</sup>	7,01 ± 1,54 <sup>a</sup>	7,07 ± 1,6 <sup>a</sup>	7,20 ± 1,56 <sup>a</sup>
Cor	7,73 ± 1,12 <sup>a</sup>	7,71 ± 1,24 <sup>a</sup>	7,62 ± 1,22 <sup>a</sup>	7,61 ± 1,20 <sup>a</sup>
Textura	6,82 ± 1,68 <sup>a</sup>	6,91 ± 1,74 <sup>a</sup>	6,92 ± 1,75 <sup>a</sup>	6,63 ± 1,86 <sup>a</sup>
Sabor	6,65 ± 1,84 <sup>a</sup>	6,60 ± 2,10 <sup>a</sup>	6,51 ± 2,29 <sup>a</sup>	6,52 ± 1,91 <sup>a</sup>
Aroma	6,83 ± 1,53 <sup>a</sup>	6,72 ± 1,71 <sup>a</sup>	6,90 ± 1,68 <sup>a</sup>	6,80 ± 1,50 <sup>a</sup>
Avaliação global	6,77 ± 1,61 <sup>a</sup>	6,76 ± 1,72 <sup>a</sup>	6,74 ± 1,69 <sup>a</sup>	6,60 ± 1,84 <sup>a</sup>
<b>Intenção de compra</b>	3,71 ± 1,17 <sup>a</sup>	3,58 ± 1,16 <sup>a</sup>	3,47 ± 1,120 <sup>a</sup>	3,46 ± 1,25 <sup>a</sup>

Controle: creme de ricota caprino sem probióticos adicionados; MAL: micropartículas de alginato liofilizadas; MAQL: micropartículas de alginato revestidas de quitosana com concentração de 0,5% liofilizadas. Os valores expressos são médias de três ensaios independentes ± desvio padrão. <sup>a-b</sup>: letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre as amostras, de acordo com o teste de Tukey (n=100).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos mostram que a microencapsulação com alginato, com e sem cobertura de quitosana, utilizando a técnica de gelificação iônica externa por extrusão é uma metodologia adequada, produzindo micropartículas esféricas e uniformes. A cultura probiótica *L. acidophilus* La-05 microencapsulada mantém as contagens adequadas (> 6 log UFC/mL) durante o armazenamento refrigerado, em condições de estresse (térmico, osmótico e baixos valores de pH) e em exposição ao trato gastrointestinal simulado quando incorporado em extratos hidrossolúveis de arroz e soja, leites caprino e bovino, exibindo viabilidade celular superior à da cepa na forma livre. Embora o leite bovino e caprino exerça maior proteção ao probiótico, os extratos hidrossolúveis de arroz e soja também são veículos adequados para as micropartículas de *L. acidophilus* La-05, com contagem suficiente para proporcionar benefícios à saúde. A incorporação das micropartículas probióticas nos extratos hidrossolúveis vegetais de arroz e soja impacta positivamente nas características físico-químicas, apresentando produtos com baixa acidez e levemente adocicados. Com relação ao creme de ricota caprino, a microencapsulação aumenta a sobrevivência da cepa probiótica durante o armazenamento refrigerado e digestão *in vitro* (contagens superiores a 6 log UFC/mL) e melhora os parâmetros de qualidade do produto (sem perda de umidade, menor proteólise, menor produção de ácidos orgânicos, textura com menos elasticidade e adesividade e perfil volátil composto por aroma "caprino" menos pronunciado). A incorporação de *L. acidophilus* La-05 livre ou microencapsulado não afetou a análise sensorial do produto. Os resultados do presente estudo são importantes para a indústria de alimentos, pois indicam tanto matrizes não lácteas (extratos hidrossolúveis de arroz e soja) como matrizes lácteas (leite bovino, leite caprino, e creme de ricota caprino) adequadas para incorporação de *L. acidophilus* La-05 microencapsulado.

## REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHZADEH, S. M.; ZAHEDANI, M. R.; RAHMDEL, S.; HEMMATI, F.; MAZLOOMI, S. M. Development of *Lactobacillus acidophilus*-fermented milk fortified with date extract. **LWT-Food Science and Technology**, v. 98, p. 577-582, 2018.
- ABOU-DOBARA, M. I.; ISMAIL, M. M.; REFAAT, N. M. Chemical composition, sensory evaluation and starter activity in cow, soy, peanut and rice milk. **Journal of Nutritional Health and Food Engineering**, v. 5, p. 1-8, 2016.
- AGÜERO, L.; ZALDIVAR-SILVA, D.; PENA, L.; DIAS, M. L. Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 168, p. 32–43, 2017.
- ALBENZIO, M.; SANTILLO, A. Biochemical characteristics of ewe and goat milk: Effect on the quality of dairy products. **Small Ruminant Research**, v. 101, p. 33-40, 2011.
- ALVES, M.; PERES, C. M.; HERNANDEZ-MENDONZA, A.; BRONZE, M. R.; PERES, C.; MALCATA, F. X. Olive paste as vehicle for delivery of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* 33. **Food Research International**, v. 75, p. 61–70, 2015.
- ANSARI, F.; POURJAFAR, H.; JODAT, V.; SAHEBI, J.; ATAEI, A. Effect of Eudragit S100 nanoparticles and alginate chitosan encapsulation on the viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus*. **AMB Express**, v. 7, p. 144, 2017.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista das alegações aprovadas**. Atualizado em março 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>>. Acesso em: 14 jul. 2020.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. Washington DC, 2005.
- APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington, DC, 2001.
- ARSLAN-TONTUL, S.; ERBAS, M. Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. **LWT - Food Science and Technology**, v. 18, p. 160-169, 2017.
- ASPRI, M.; PAPADEMAS, P.; TSALTAS, D. Review on non-dairy probiotics and their use in non-dairy based products. **Fermentation**, v. 6, p. 30, 2020.

ASHWAR, B. A.; GANI, A.; GANI, A.; SHAH, A.; MASOODI, F. A. Production of RS4 from rice starch and its utilization as an encapsulating agent for targeted delivery of probiotics. **Food Chemistry**, v. 239, p. 287-294, 2018.

BAGAROLLI, R. A.; TOBAR, N.; OLIVEIRA, A. G.; ARAÚJO, T. G.; CARVALHO, B. M. ROCHA, G. Z.; VECINA, J. F.; CALISTO, K.; GUADAGNINI, D.; PRADA, P. O.; SANTOS, A.; SAAD, S. T. O.; SAAD, M. J. A. Probiotics modulate gut microbiota and improve insulin sensitivity in DIO mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 50, p. 16-25, 2017.

BAKIRTZI, K.; LAW, I. K. M.; XUE, X.; ILIOPOULOS, D.; SHAH, Y.M.; POTHOUKAKIS, C. Neurotensin promotes the development of colitis and intestinal angiogenesis via Hif-1 $\alpha$ -miR-210 signaling. **The Journal of Immunology**, v. 196, p. 4311-4321, 2016.

BARBOSA, I. C.; DE OLIVEIRA, M. E. G.; MADRUGA, M. S.; GULLÓN, B.; PACHECO, M. T. B.; GOMES, A. M. P.; BATISTA, A. S. M.; PINTADO, M. M. E.; SOUZA, E. L.; QUEIROGA, R. C. R. E. Influence of the addition of *Lactobacillus acidophilus* La-05, *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis Bb-12 and inulin on the technological, physicochemical, microbiological and sensory features of creamy goat cheese. **Food and Function**, v. 7, p. 4356-4371, 2016.

BARBOSA, J.; TEIXEIRA, P. Development of probiotic fruit juice powders by spray-drying: A review. **Food Reviews International**, v. 33, p. 335-358, 2017.

BATTELLI, G.; SCANO, P.; ALBANO, C.; CAGLIANI, L. R.; BRASCA, M.; CONSONNI, R. Modifications of the volatile and nonvolatile metabolome of goat cheese due to adjunct of non-starter lactic acid bacteria. **LWT-Food Science and Technology**, v. 116, p. 108576, 2019.

BATTISTINI, C.; GULLÓN, B.; ICHIMURA, E. S.; GOMES, A. M. P.; RIBEIRO, E. P.; KUNIGK, L.; MOREIRA, J. U. V.; JURKIEWICZ, C. Development and characterization of an innovative synbiotic fermented beverage based on vegetable soybean. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p.303–309, 2018.

BEDADE, D. K.; SUTAR, Y. B.; SINGHAL, R. S. Chitosan coated calcium alginate beads for covalent immobilization of acrylamidase: Process parameters and removal of acrylamide from coffee. **Food Chemistry**, v. 275, p. 95-104, 2019.

BEHERA, S. S.; PANDA, S. K. Ethnic and industrial probiotic foods and beverages: efficacy and acceptance. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 29-36, 2020.

BERGER, L. R. R.; STAMFORD, T. C. M.; DE OLIVEIRA, K. A. R.; PESSOA, A. M. P.; DE LIMA, M. A. B.; PINTADO, M. M. E.; CÂMARA, M. P. S.; FRANCO, L. O.; MAGNANI, M.; DE SOUZA, E. L. Chitosan produced from Mucorales fungi using agroindustrial by-products and its efficacy to inhibit *Colletotrichum* species. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 635-641, 2018.

BEZERRA, T. K. A.; DE ARAÚJO, A. R. R.; DO NASCIMENTO, E. S.; PAZ, J. E. M.; GADELHA, C. A.; GADELHA, T. S.; PACHECO, M. T. B.; QUEIROGA, R. C. R. E.; DE OLIVEIRA, M. E. G.; MADRUGA, M. S. Proteolysis in goat “coalho” cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. **Food Chemistry**, v. 196, p. 359-366, 2016.

BEZERRA, T. K. A.; ARCANJO, N. M. O.; ARAÚJO, A. R. R.; QUEIROZ, A. L. M.; OLIVEIRA, M. E. G.; GOMES, A. M. P.; MADRUGA, M.S. Volatile profile in goat coalho cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. **LWT – Food Science and Technology**, v. 76, p. 209-215, 2017 a.

BEZERRA, T. K. A.; ARCANJO, N. M. O.; GARCIA, E. F.; GOMES, A. M. P.; QUEIROGA, R. C. R. E.; DE SOUZA, E. L.; MADRUGA, M. S. Effect of supplementation with probiotic lactic acid bacteria, separately or combined, on acid and sugar production in goat ‘coalho’ cheese. **LWT-Food Science and Technology**, v. 75, p. 710-718, 2017 b.

BORBA, K. K. S.; SILVA, F. A.; MADRUGA, M. S.; QUEIROGA, R. C. R. E.; SOUZA, E. L.; MAGNANI, M. The effect of storage on nutritional, textural and sensory characteristics of creamy ricotta made from whey as well as cow's milk and goat's milk. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 1279–1286, 2013.

BRASIL. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, 1996.

BRASIL. Instrução Normativa nº 37, de 31 de outubro de 2000. Aprova o regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite de cabra. MAPA - Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Diário Oficial da União**, 2000.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimento. **Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b)>. Acesso em: 23 jul. 2020.

BRASIL. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, 2017.

BRASIL. Resolução RDC nº 241, de 26 de julho de 2018. Regulamento técnico sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. **Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 15 jul. 2020.

BRASIL. Instrução Normativa nº 65, de 21 de julho de 2020. Dispõe sobre a identidade e os requisitos de qualidade que deve apresentar o produto denominado ricota. MAPA - Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Diário Oficial da União**, 2020.

BROECKX, G.; VANDENHEUVEL, D.; CLAES, I. J. J.; LEBEER, S.; KIEKENS, F. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 505, p. 303-318, 2016.

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

BURITI, F. C. A.; CARDARELLI, H. R.; FILISETTI, T. M. C. C.; SAAD, S. M. I. Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. **Food Chemistry**, v.104, p.1605–1610, 2007.

CAI, S.; ZHAO, M.; FANG, Y.; NISHINARI, K.; PHILLIPS, G. O.; JIANG, F. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* CGMCC1.2686 via emulsification/internal gelation of alginate using Ca-EDTA and CaCO<sub>3</sub> as calcium sources. **Food Hydrocolloids**, v.39, p.295-300, 2014.

CAMPOS, E.; BRANQUINHO, J.; CARREIRA, A. S.; CARVALHO, A.; COIMBRA, P.; FERREIRA, P.; GIL, M. H. Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. **European Polymer Journal**, v. 49, p. 2005-2021, 2013.

CAMPOS, R. C. A. B.; MARTINS, E. M. F.; PIRES, B. A.; PELUZIO, M. C. G.; CAMPOS, A. N. R.; RAMOS, A. M.; LEITE JUNIOR, B. R. C.; MARTINS, A. D. O.; SILVA, R. R.; MARTINS, M. L. In vitro and in vivo resistance of *Lactobacillus rhamnosus* GG carried by a mixed pineapple (*Ananas comosus* L. Merril) and jussara (*Euterpe edulis* Martius) juice to the gastrointestinal tract. **Food Research International**, v. 116, p. 1247–1257, 2019.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v. 445, p. 385-396, 2013.

CARVALHO, A. G. S.; MACHADO, M. T. C.; BARROS, H. D. F. Q. B.; CAZARIN, C. B. B.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. B.; HUBINGER, M. D. Anthocyanins from jussara (*Euterpe edulis* Martius) extract carried by calcium alginate beads pre-prepared using ionic gelation. **Powder Technology**, v. 345, p. 283-291, 2019.

CASTRO-CISLAGHI, F. P.; SILVA, C. R.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; LORENZ, J. G.; SANT'ANNA, E. S. *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with

whey: survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 113, p. 186–193, 2012.

CASTRO-ROSAS, J.; FERREIRA-GROSSO, C. R. GÓMEZ-ALDAPA, C. A.; RANGEL-VARGAS, E.; RODRÍGUEZ-MARÍN, M. A.; GUZMÁN-ORTIZ, F. A.; FALFAN-CORTES, R. N. Recent advances in microencapsulation of natural sources of antimicrobial compounds used in food - A review. **Food Research International**, v. 102, p. 575-587, 2017.

CHÁVARRI, M.; MARANON, I.; ARES, R.; IBANEZ, F. C.; MARZO, F.; VILLARAN, M. C. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.142, p. 185-189, 2010.

CHEN, H.; LI, X.; LIU, B.; MENG, X. Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, v. 29, p. 248–255, 2017.

CHEN, L.; ZHANG, Q.; JI, Z.; SHU, G.; CHEN, H. Production and fermentation characteristics of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides of goat milk fermented by a novel wild *Lactobacillus plantarum* 69. **LWT-Food Science and Technology**, v. 91, p. 532-540, 2018.

CIE - **Commission Internationale de l'Eclairage**. Ocular Lighting Effects on Human Physiology and Behaviour, Commission Internationale de L'Eclairage. Vienna, 2004.

CLARK, S.; GARCÍA, M. B. A 100-year review: Advances in goat milk research. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 10026-10044, 2017.

COOK, M. T.; TZORTZIS, G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; KHUTORYANSKIY, V.V. Production and evaluation of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. **Biomacromolecules**, v.12, p. 2834-2840, 2011.

COSTA, G. M.; PAULA, M. M.; BARÃO, C. E.; KLOSOSKI, S. J.; BONAFÉ, E. G.; VISENTAINER, I. V.; CRUZ, A. G.; PIMENTEL, T. C. Yoghurt added with *Lactobacillus casei* and sweetened with natural sweeteners and/or prebiotics: Implications on quality parameters and probiotic survival. **International Dairy Journal**, v. 97, p. 139-148, 2019.

CROSS, M. L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **Immunology and Medical Microbiology**, p. 245-253, 2002.

DARJANI, P.; NEZHAD, M. H.; KADKHODAEI, R.; MILANI, E. Influence of prebiotic and coating materials on morphology and survival of a probiotic strain of *Lactobacillus casei* exposed to simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 162-167, 2016.

- DASARI, S.; KATHERA, C.; JANARDHAN, A.; KUMAR, A. P.; VISWANATH, B. Surfacing role of probiotics in cancer prophylaxis and therapy: A systematic review. **Clinical Nutrition**, v. 36, p. 1465-1472, 2017.
- DE FARIAS, T. G. S.; LADISLAU, H. F. L.; STAMFORD, T. C. M.; MEDEIROS, J. A. C.; SOARES, B. L. M.; ARNAUD, T. M. S.; STAMFORD, T. L. M. 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**, v. 100, p. 391-396, 2019.
- DE LACEY, A. M. L.; PÉREZ-SANTÍN, E.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, P. Survival and metabolic activity of probiotic bacteria in green tea. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 314–322, 2014.
- DE MEDEIROS, E.; QUEIROGA, R.; OLIVEIRA, M.; MEDEIROS, A.; SABEDOT, M.; BOMFIM, M.; MADRUGA, M. Fatty acid profile of cheese from dairy goats fed a diet enriched with castor, sesame and faveleira vegetable oils. **Molecules**, v.19, p. 992-1003, 2014.
- DE PRISCO, A.; MARESCA, D.; ONGENG, D.; MAURIELLO, G. Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. **Food Science and Technology**, v. 61, p. 452-462, 2015.
- DIMA, C.; PĂTRAȘCU, L.; CANTARAGIU, A.; ALEXE, P.; DIMA, Ș. The kinetics of the swelling process and the release mechanisms of *Coriandrum sativum* L. essential oil from chitosan/alginate/inulin microcapsules. **Food Chemistry**, v.195, p. 39–48, 2016.
- DING, W.; SHI, C.; CHEN, M.; ZHOU, J.; LONG, R.; GUO, X. Screening for lactic acid bacteria in traditional fermented Tibetan yak milk and evaluating their probiotic and cholesterol-lowering potentials in rats fed a high-cholesterol diet. **Journal of Functional Foods**, v. 31, p. 324-332, 2017.
- D'ORAZIO, G.; DI GENNARO, P.; BOCCARUSSO, M.; PRESTI, I.; BIZZARO, G.; GIARDINA, S.; MICHELOTTI, A.; LABRA, M.; LA FERLA, B. Microencapsulation of new probiotic formulations for gastrointestinal delivery: In vitro study to assess viability and biological properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 9779-9789, 2015.
- EGITO, A. S.; BENEVIDES, S. D.; LAGUNA, L. E.; SANTOS, K. O. **Processamento de Ricota a partir do Soro de Queijos de Cabra. Comunicado Técnico – EMBRAPA Caprinos. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). 1 ed. Sobral/Ceará – 2007.**
- EJTAHED, H.; ANGOORANI, P.; SOROUSH, A.; ATLASI, R.; HASANI-RANJBAR, S.; MORTAZAVIAN, A. M.; LARIJANI, B. Probiotics supplementation for the obesity

management; A systematic review of animal studies and clinical trials. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 228–242, 2019.

EL GALIOU, O.; ZANTAR, S.; BAKKALI, M.; LAGLAOUI, A.; CENTENO, J. A.; CARBALLO, J. Chemical and microbiological characteristics of traditional homemade fresh goat cheeses from Northern Morocco. **Small Ruminant Research**, v. 129, p.108-113, 2015.

EL-SALAM, M. H.; EL-SHIBINY, S. Formation and potential uses of milk proteins as nano delivery vehicles for nutraceuticals: a review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, p. 13-21, 2012.

ESPITIA, P. J. P.; BATISTA, R. A.; AZEREDO, H. M. C.; OTONI, C. G. Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. **Food Research International**, v. 90, p. 42-52, 2016.

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

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Food based dietary guidelines**. 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/nutrition/nutrition-education/food-dietary-guidelines/en/>>. Acesso em: 13 jul. 2020.

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Acesso em: 3 jul. 2020.

FAZILAH, N. F.; ARIFF, A. B.; KHAYAT, M. E.; RIOS-SOLIS, L.; HALIM, M. Influence of probiotics, prebiotics, synbiotics and bioactive phytochemicals on the formulation of functional yogurt. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p. 387–399, 2018.

FERNANDES, A.; BARREIRA, J. C. M.; BARROS, L.; MENDONÇA, A.; FERREIRA, I. C. F. R.; SOUSA, F. R. Chemical and physicochemical changes in serrana goat cheese submitted to extra-long ripening periods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, p. 33-39, 2018.

FIORAMONTI, S. A.; RUBIOLO, A. C.; SANTIAGO, L. G. Characterisation of freeze-dried flaxseed oil microcapsules obtained by multilayer emulsions. **Powder Technology**, v. 319, p. 238-244, 2017.

FLOCH, M. H. The role of prebiotics and probiotics in gastrointestinal disease. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 47, p. 179-191, 2018.

FONSECA, J. M.; MEDEIROS, S. F.; ALVES, G. M.; SANTOS, D. M.; CAMPANA-FILHO, S. P.; SANTOS, A. M. Chitosan microparticles embedded with multi-

responsive poly (Nvinylcaprolactam-co-itaconic acid-co-ethylene-glycol dimethacrylate)-based hydrogel nanoparticles as a new carrier for delivery of hydrophobic drugs. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 73-83, 2019.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. 2 ed. New York: Springer, p. 533-542, 2017.

FREIRE, A. L.; RAMOS, C. L.; SCHWAN, R. F. Effect of symbiotic interaction between a fructooligosaccharide and probiotic on the kinetic fermentation and chemical profile of maize blended rice beverages. **Food Research International**, v. 100, p. 698-707, 2017.

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

GÁMBARO, A.; GONZÁLEZ, V.; JIMÉNEZ, S.; ARECHAVALETA, A.; IRIGARAY, B.; CALLEJAS, N.; GROMPONE, M.; VIEITEZ, I. Chemical and sensory profiles of commercial goat cheeses. **International Dairy Journal**, v. 69, p. 1-8, 2017.

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

GEORGE, M.; ABRAHAM, E. T. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan – a review. **Journal of controlled release**, v. 114, p.1-14, 2006.

GOMES, J. J. L.; DUARTE, A. M.; BATISTA, A. S. M.; DE FIGUEIREDO, M. F.; DE SOUSA, E. P.; DE SOUSA, E. L.; QUEIROGA, R. C. R. E. Physicochemical and sensory properties of fermented dairy beverages made with goat's milk, cow's milk and a mixture of the two milks. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, p. 18-24, 2013.

GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; SHAH, N. P. Probiotic dairy products as functional foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 455-470, 2010.

GRILLE, L.; CARRO, S.; ESCOBAR, D.; BENTANCOR, L.; BORGES, A.; MARTINEZ, D. C.; FROS, C.; GONZÁLEZ, S. Evaluation of hygienic sanitary and composition quality of goat milk in a saanen breed herd. **Innotec**, v. 8, p. 52-59, 2013.

GROM, C. L.; COUTINHO, N. M.; GUIMARÃES, J. T.; BALTHAZAR, C. F.; SILVA, R.; ROCHA, R. S.; FREITAS, M. Q.; DUARTE, M. C. K. H.; PIMENTEL, T. C.; ESERINO, E. A.; SILVA, M. C.; CRUZ, A. G. Probiotic dairy foods and postprandial

glycemia: A mini review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 101, p. 165-171, 2020.

GUEDES, J. S.; PIMENTEL, T. C.; DINIZ-SILVA, H. T.; ALMEIDA, E. T. C.; TAVARES, J. F.; DE SOUZA, E. L.; GARCIA, E. F.; MAGNANI, M. Protective effects of  $\beta$ -glucan extracted from spent brewer yeast during freeze-drying, storage and exposure to simulated gastrointestinal conditions of probiotic lactobacilli. **LWT - Food Science and Technology**, v. 116, p. 108496, 2019.

GUERRA, I. C. D.; OLIVEIRA, P. D. L.; PONTES, A. L. S.; LÚCIO, A. S. S. C.; TAVARES, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MADRUGA, M. S.; SOUZA, E. L. Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. **International Journal of Food Microbiology**, v. 214, p.168-178, 2015.

HALIM, M.; MUSTAFA, N. A. M.; OTHMAN, M.; WASOH, H.; KAPRI, M. R.; ARIFF, A. B. Effect of encapsulant and cryoprotectant on the viability of probiotic *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 during freeze-drying and exposure to high acidity, bile salts and heat. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 210-216, 2017.

HE, L.; GUO, X.; ZHU, K. Effect of soybean milk addition on the quality of frozen-cooked noodles. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 187–193, 2019.

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

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 121–129, 2001.

HIBBERD, A. A.; LYRA, A.; OUWEHAND, A. C.; ROLNY, P.; LINDEGREN, H.; CEDGÅRD, L.; WETTERGREN, Y. Intestinal microbiota is altered in patients with colon cancer and modified by probiotic intervention. **BMJ Open Gastroenterology**, v. 4, 2017.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, E. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506-514, 2014.

HODGKINSON, A.J.; WALLACE, O.A.M.; BOGGS, I.; BROADHURST, M.; PROSSER, C.G. Gastric digestion of cow and goat milk: Impact of infant and young child *in vitro* digestion conditions. **Food Chemistry**, v. 245, p. 275-281, 2018.

HOLKEM, A. T.; RADDATZ, G. C.; NUNES, G. L.; CICHOSKI, A. J.; JACOB-LOPES, E.; GROSSO, C. R. F.; MENEZES, C. R. Development and characterization of alginate microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 produced by emulsification/internal gelation followed by freeze drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 302–308, 2016.

HOLZAPFEL, W. H.; WOOD, B. J. B. **Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy**. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley e Sons, 2014.

HUAMANI-PALOMINO, R. G.; JACINTO, C. R.; ALARCÓN, H.; MEJÍA, I. M.; LÓPEZ, R. C.; SILVA, D. O.; CAVALHEIRO, E. T. G.; VENÂNCIO, T.; DÁVALOS, J. Z.; VALDERRAMA, A. C. Chemical modification of alginate with cysteine and its application for the removal of Pb(II) from aqueous solutions. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018.

HUQ, T.; FRASCHINI, C.; KHAN, A.; RIEDL, B.; BOUCHARD, J.; LACROIX, M. Alginate based nanocomposite for microencapsulation of probiotic: Effect of cellulose nanocrystal (CNC) and lecithin. **Carbohydrate Polymers**, v.168, p. 61–69, 2017.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário 2017. Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Resultados Preliminares**. Disponível em: < <https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/>>. Acesso em: 22 jun. 2020.

ISLAM, S.U. Clinical uses of probiotics. **Medicine**, v. 95, p. 1-5, 2016.

JANISZEWSKA-TURAK, E. Carotenoids microencapsulation by spray drying method and supercritical micronization. **Food Research International**, v. 99, p. 891-901, 2017.

JANTARATHIN, S.; BOROMPICHAICHARTKUL, C.; SANGUANDEEKUL, R. Microencapsulation of probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules and its effect on viability under heat process in shrimp feeding. **Materials Today: Proceedings**, v.4, p. 6166-6172, 2017.

JAYABALAN, R.; MALBAŠA, R. V.; LONČAR, E. S.; VITAS, J. S.; SATHISHKUMAR, M. A review on kombucha tea—microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 538-550, 2014.

JIANG, T.; SINGH, B.; MAHARJAN, S.; LI, H.; KANG, S.; BOK, J.; CHO, C.; CHOI, Y. Oral delivery of probiotic expressing M cell homing peptide conjugated BmpB vaccine encapsulated into alginate/chitosan/alginate microcapsules. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, p. 768-777, 2014.

KANDYLIS, P.; PISSARIDI, K.; BEKATOROU, A.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A. Dairy and non-dairy probiotic beverages. **Food Science**, v. 7, p. 58-63, 2016.

- KANMANI, P.; KUMAR, R. S.; YUVARAJ, N.; PAARI, K. A.; PATTUKUMAR, V.; ARUL, V. Effect of cryopreservation and microencapsulation of lactic acid bacterium *Enterococcus faecium* MC13 for long-term storage. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58-59, p.140-147, 2011.
- KERRY, R. G.; PATRA, J. K.; GOUDA, S.; PARK, Y.; SHIN, H.; DAS, G. Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, p. 927-939, 2018.
- KIM, K. W.; MIN, B. J.; KIM, Y.; KIMMEL, R. M.; COOKSEY, K.; PARK, S. I. Antimicrobial activity against foodborne pathogens of chitosan biopolymer films of different molecular weights. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, p. 565-569, 2011.
- KLINDT-TOLDAM, S.; LARSEN, S. K.; SAABY, L.; OLSEN, L. R.; SVENSTRUP, G.; MÜLLERTZ, A.; KNØCHEL, S.; HEIMDAL, H.; NIELSEN, D.; ZIELINSKA, D. Survival of *Lactobacillus acidophilus* NCFM® and *Bifidobacterium lactis* HN019 encapsulated in chocolate during in vitro simulated passage of the upper gastrointestinal tract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 404-410, 2016.
- KOLLATH, W. Nutrition and the tooth system; general review with special reference to vitamins. **Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift**, v. 8, p. 7-16, 1953.
- KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, v.13, p. 3-13, 2003.
- KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 737-743, 2004.
- KRISTENSEN, N. B.; BRYRUP, T.; ALLIN, K. H.; NIELSEN, T.; HANSEN, T. H.; PEDERSEN, O. Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. **Genome Medicine**, v. 8, p. 1-11, 2016.
- KUROZAWA, L. E.; HUBINGER, M. D. Hydrophilic food compounds encapsulation by ionic gelation. **Current Opinion in Food Science**, v.15, p. 50-55, 2017.
- LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 4, p. 728 - 764, 2008.
- LEE, D. K.; PARK, J. E.; KIM, M. J.; SEO, J. G.; LEE, J. H.; HA, N. J. Probiotic bacteria, *B. longum* and *L. acidophilus* inhibit infection by rotavirus in vitro and decrease the duration of diarrhea in pediatric patients. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 39, p. 237—244, 2015.

- LI, Y.; FENG, C.; LI, J.; MU, Y.; LIU, Y.; KONG, M.; CHENG, X.; CHEN, X. Construction of multilayer alginate hydrogel beads for oral delivery of probiotics cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 924-930, 2017.
- LI, H.; ZHANG, T.; LI, C.; ZHENG, S.; LI, H.; YU, J. Development of a microencapsulated synbiotic product and its application in yoghurt. **LWT - Food Science and Technology**, v. 122, p. 109033, 2020.
- LILLEY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, p. 747-748, 1965.
- LING, K.; WU, H.; NEISH, A. S.; CHAMPION, J. A. Alginate/chitosan microparticles for gastric passage and intestinal release of therapeutic protein nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 295, p. 174-186, 2019.
- LIU, L.; CHEN, P.; ZHAO, W.; LI, X.; WANG, H.; QU, X. Effect of microencapsulation with the maillard reaction products of whey proteins and isomaltooligosaccharide on the survival rate of *Lactobacillus rhamnosus* in white brined cheese. **Food Control**, v. 79, p. 44-49, 2017.
- LIU, Y.; SUN, Y.; SUN, L.; RIZWAN-UR-REHMAN; WANG, Y. In vitro and in vivo study of sodium polyacrylate grafted alginate as microcapsule matrix for live probiotic delivery. **Journal of Functional Foods**, v. 24, p. 429-437, 2016.
- LORDAN, R.; TSOUPRAS, A.; MILTRA, B.; ZABETAKIS, I. Dairy Fats and Cardiovascular Disease: Do We Really Need to Be Concerned? **Foods**, v. 7, p. 29, 2018.
- LUCIANO, W. A.; MATTE, T. C.; PORTELA, I. A.; MEDEIROS, L. L.; LIMA, M. S.; MACIEL, J. F.; SOUZA, E. L.; GARCIA, E. F.; MAGNANI, M. Effects of *Lactobacillus acidophilus* LA-3 on physicochemical and sensory parameters of açai and mango based smoothies and its survival following simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 114, p. 159–168, 2018.
- LÜCKE, F. K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, v. 56, p. 105-15, 2000.
- LUPO, B.; MAESTRO, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; GONZÁLEZ, C. Characterization of alginate beads with encapsulated cocoa extract to prepare functional food: Comparison of two gelation mechanisms. **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 25-34, 2015.
- MACHADO, T. A. D. G.; OLIVEIRA, M. E. G.; CAMPOS, M. I. F.; ASSIS, P. O. A.; SOUZA, E. L.; MADRUGA, M. S.; PACHECO, M. T. B.; PINTADO, M. M. E.; QUEIROGA R. C. R. E. Impact of honey on quality characteristics of goat yogurt containing probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 80, p. 221-229, 2017.

MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, p. 465–470, 2011.

MAJEED, M.; MAJEED, S.; NAGABHUSHANAM, K.; ARUMUGAM, S.; BEEDE, K.; ALI, F. Evaluation of probiotic *Bacillus coagulans* MTCC 5856 viability after tea and coffee brewing and its growth in GIT hostile environment. **Food Research International**, 2018.

MÄKINEN, O. E.; UNIACKE-LOWE, T.; O'MAHONY, J. A.; ARENDT, E. K. Physicochemical and acid gelation properties of commercial UHT-treated plant-based milk substitutes and lactose free bovine milk. **Food Chemistry**, v. 168, p. 630-638, 2015.

MANTOVANI, F. D.; BASSETTO, M. C.; DE SOUZA, C. H. B.; ARAGON, D. C.; DE SANTANA, E. H. W.; PIMENTEL, T. C.; ARAGON-ALEGRO, L. C. Is there an impact of the dairy matrix on the survival of *Lactobacillus casei* Lc-1 during shelf life and simulated gastrointestinal conditions? **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, p. 32-37, 2020.

MARTÍN, M. J.; LARA-VILLOSLADA, F.; RUIZ, M. A.; MORALES, M. E. Microencapsulation of bacteria: a review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 27, p. 15-25, 2015.

MATOS-JR, F. E.; SILVA, M. P.; KASEMODEL, M. G. C.; SANTOS, T. T.; BURNS, P.; REINHEIMER, J.; VINDEROLA, G.; FAVARO-TRINDADE, C. S. 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**, v. 54, p. 98–108, 2019.

MEILGAARD, M. C.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory Evaluation Techniques**. 4 ed. New York: CRC Press, 2007.

MEIRA, Q. G. S.; MAGNANI, M.; MEDEIROS JÚNIOR, F. C. M.; QUEIROGA, R. C. R. E. ; MADRUGA, M. S.; GULLÓN, B.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. M. E. P.; SOUZA, E. L. Effects of added *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* probiotics on the quality characteristics of goat ricotta and their survival under simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 76, p. 828–838, 2015.

MENNAH-GOVELA, Y. A.; SINGH, R. P.; BORNHORST, G. M. Buffering capacity of protein-based model food systems in the context of gastric digestion. **Food and Function**, v. 10, 2019. DOI: 10.1039/C9FO01160A

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

MILORADOVIC, Z. N.; KLJAJEVIC, N. V.; JOVANOVIC, S. T.; VUCIC, T. R.; MACEJ, O. D. The effect of heat treatment and skimming on precipitate formation in caprine and bovine milks. **Journal of Dairy Research**, v. 82, p. 22-28, 2015.

MIN, M.; BUNT, C. R.; MASON, S. L.; HUSSAIN, M. A. Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, p. 2626-2641, 2019.

MIRANDA, R. F.; DE PAULA, M. M.; DA COSTA, G. M.; BARÃO, C. E.; DA SILVA, A. C. R.; RAICES, R. S. L.; GOMES, R. G.; PIMENTEL, T. C. Orange juice added with *L. casei*: is there an impact of the probiotic addition methodology on the quality parameters? **LWT-Food Science and Technology**, v. 106, p. 186-193, 2019.

MOKHTARI, S.; JAFARI, S. M.; KHOMEIRI, M.; MAGHSOUDLOU, Y.; GHORBANI, M. The cell wall compound of *Saccharomyces cerevisiae* as a novel wall material for encapsulation of probiotics. **Food Research International**, v. 96, p. 19-26, 2017.

MOLKENTIN, J.; PRECHT, D. Validation of a gas-chromatographic method for the determination of milk fat contents in mixed fats by butyric acid analysis. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, p. 194-201, 2000.

MOREIRA, R. V.; COSTA, M. P.; CASTRO, V. S.; PAES, C. E.; MUTZ, Y. S.; FRASAO, B. S.; MANO, S. B.; CONTE-JUNIOR, C. A. Short communication: Antimicrobial activity of pequi (*Caryocar brasiliense*) waste extract on goat Minas Frescal cheese presenting sodium reduction. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 2966-2972, 2019.

MUELAS, R.; MARTÍ DE OLIVES, A.; ROMERO, G.; DÍAZ, J. R.; SAYAS-BARBERÁ, M. E.; SENDRA, E. Evaluation of individual lactic acid bacteria for the fermentation of goat milk: Quality parameters. **LWT-Food Science and Technology**, v. 98, p. 506-514, 2018.

MUGARAB-SAMEDIA, V.; HOWLETT, A.; HICKS, M.; ARRIETA, M.; BEAUDRY, P.; DERSCH-MILLS, D.; ALSHAIKH, B. Probiotics supplementation and length of hospital stay in neonates with gastrointestinal surgery. **International Journal of Surgery Protocols**, v. 6, p. 13-16, 2017.

MUNOZ, I. B.; VERRUCK, S.; CANELLA, M. H. M.; DIAS, C. O.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDENCIO, E. S. The use of soft fresh cheese manufactured from freeze concentrated milk as a novelty protective matrix on *Bifidobacterium* BB-12 survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 97, p. 725-729, 2018.

NASCIMENTO, J. I. G.; STAMFORD, T. C. M.; MELO, N. F. C. B.; NUNES, I. S.; LIMA, M. A. B.; PINTADO, M. M. E.; STAMFORD-ARNAUD, T. M.; STAMFORD, N. P.; STAMFORD, T. L. M. Chitosan–citric acid edible coating to control *Colletotrichum gloeosporioides* and maintain quality parameters of fresh-cut guava. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 1127-1135, 2020.

NAVEED, M.; PHIL, L.; SOHAIL, M.; HASNAT, M.; BAIG, M. M. F. A.; IHSAN, A. U.; SHUMZAID, M.; KAKAR, M. U.; KHAN, T. M.; AKABAR, M. D.; HUSSAIN, M. I.; ZHOU, Q. Chitosan oligosaccharide (COS): An overview. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 827-843, 2019.

NEGM, N. A.; KANA, M. T. H. A.; ABUBSHAIT, S. A.; BETIHA, M. A. Effectuality of chitosan biopolymer and its derivatives during antioxidant applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 1342-1369, 2020.

NINGTYAS, D. W.; BHANDARI, B.; BANSAL, N.; PRAKASH, S. The viability of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* (non-encapsulated and encapsulated) in functional reduced-fat cream cheese and its textural properties during storage. **Food Control**, v.100, p. 8-16, 2019.

NORDSTIERNA, L.; ABDALLA, A. A.; NORDIN, M.; NYDÉN, M. Comparison of release behaviour from microcapsules and microspheres. **Progress in Organic Coatings**, v. 69, p. 49-51, 2010.

NUALKAEKUL, S.; LENTON, D.; COOK, M. T.; KHUTORYANSKIY, V. V.; CHARALAMPOPOULOS, D. Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 1281-1287, 2012.

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

OLIVEIRA, K. A. R. O.; BERGER, L. R. R.; ARAÚJO, S. A. A.; CÂMARA, M. P. S.; SOUZA, E. L. Synergistic mixtures of chitosan and *Mentha piperita* L. essential oil to inhibit colletotrichum species and anthracnose development in mango cultivar tommy atkins. **Food Microbiology**, v. 66, p. 96-103, 2017.

OZOGUL, F.; HAMED, I. Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus acidophilus*. **Reference module in food science**, 2016.

PAKDAMAN, M. N.; UDANI, J. K.; MOLINA, J. P.; SHAHANI, M. The effects of the DDS-1 strain of lactobacillus on symptomatic relief for lactose intolerance: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover clinical trial. **Nutrition Journal**, v. 15, p 1-11, 2016.

PALOMER, X.; PIZARRO-DELGADO, J.; BARROSO, E.; VÁZQUEZ-CARRERA, M. Palmitic and oleic acid: the yin and yang of fatty acids in type 2 diabetes mellitus. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 29, p. 178-190, 2018.

PANGHAL, A.; JANGHU, S.; VIRKAR, K.; GAT, Y.; KUMAR, V.; CHHIKARA, N. Potential non-dairy probiotic products – a healthy approach. **Food Bioscience**, v. 21, p. 80-89, 2018.

PANTOA, T.; BARICEVIC-JONES, I.; SUWANNAPORN, P.; KADOWAKI, M.; KUBOTA, M.; ROYTRAKUL, S.; MILLS, E. N. C. Young rice protein as a new source of low allergenic plant-base protein. **Journal of Cereal Science**, v. 93, p. 102970, 2020.

PARAMERA, E. I.; KONTELES, S. J.; KARATHANOS, V. T. Microencapsulation of curcumin in cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Chemistry**, v. 125, p. 892–902, 2011.

PARK, Y. W. Rheological characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 73–87, 2007.

PATRIGNANI, F.; SIROLI, L.; SERRAZANETTI, D. I.; BRASCHI, G.; BETORET, E.; REINHEIMER, J. A.; LANCIOTTI, R. Microencapsulation of functional strains by high pressure homogenization for a potential use in fermented milk. **Food Research International**, v. 97, p. 250-257, 2017.

PAULO, F.; SANTOS, L. Design of experiments for microencapsulation applications: A review. **Materials Science and Engineering: C**, v. 77, p. 1327-1340, 2017.

PICON, A.; LÓPEZ-PÉREZ, O.; TORRES, E.; GARDE, S.; NUÑEZ, M. Contribution of autochthonous lactic acid bacteria to the typical flavour of raw goat milk cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 299, p. 8-22, 2019.

PIMENTEL, T. C.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. Effect of long-chain inulin on the texture profile and survival of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* in set yoghurts during refrigerated storage. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, p.104-110, 2012.

PIZZILLO, M.; CLAPS, S.; CIFUNI, G. F.; FEDELE, V.; RUBINO, R. Effect of goat breed on the sensory, chemical and nutritional characteristics of ricotta cheese. **Livestock Production Science**, v. 94, p. 33-40, 2005.

POLETTI, G.; FONSECA, B. D. S.; RADDATZ, G. C.; WAGNER, R.; LOPES, E. J.; BARIN, J. S.; FLORES, E. M. M.; MENEZES, C. R. D. Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and different prebiotic agents by external ionic gelation followed by freeze-drying. **Ciência Rural**, v. 49, p. 1-7, 2019.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v.110, p. 48-68, 2012.

PULINA, G.; MILÁN, M. J.; LAVÍN, M. P.; THEODORIDIS, A.; MORIN, E.; CAPOTE, J.; THOMAS, D. L.; FRANCESCONI, A. H. D.; CAJA, G. Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 6715-6729, 2018.

PUNIA, S.; SANDHU, K. S.; SIROHA, A. K.; DHULL, S. B. Omega 3-metabolism, absorption, bioavailability and health benefits—A review. **Pharma Nutrition**, v. 10, p. 100162, 2019.

QIN, Y.; LI, P.; GUO, Z. Cationic chitosan derivatives as potential antifungals: A review of structural optimization and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 236, p. 116002, 2020.

QUEIROGA, R. C. R. E.; SANTOS, B. M.; GOMES, A. M. P.; MONTEIRO, M. J.; TEIXEIRA, S. M.; SOUZA, E. L.; PINTADO, M. M. E. Nutritional, textural and sensory properties of coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. **LWT — Food Science and Technology**, v. 50, p. 538–544, 2013.

QUIGLEY, E. M. M. Microbiome-directed therapies: past, present, and future. prebiotics and probiotics in digestive health. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, p. 333–344, 2019.

RAJAM, R.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 773-780, 2015.

RAJOKA, M. S. R.; MEHWISH, H. M.; SIDDIQ, M.; HAOBIN, Z.; ZHU, J.; YAN, L.; SHAO, D.; XU, X.; SHI, J. Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 271-280, 2017.

RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, p. 1-7, 2010.

RANADHEERA, C. S.; NAUMOVSKI, N.; AJLOUNI, S. Non-bovine milk products as emerging probiotic carriers: Recent developments and innovations. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 109-114, 2018.

RANADHEERA, C. S.; EVANS, C. A.; BAINES, S. K.; BALTHAZAR, C. F.; CRUZ, A. G.; ESMERINO, E. A.; MÔNICA, Q. F.; PIMENTEL, T. C.; WITTWER, A. E.; NAUMOVSKI, N.; GRAÇA, J. S.; SANT'ANA, A. S.; AJLOUNI, S.; VASILJEVIC, T. Probiotics in goat milk products: Delivery capacity and ability to improve sensory attributes. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, p. 867-882, 2019.

RAO, S. C.; ATHALYE-JAPE, G. K.; DESHPANDE, G. C.; SIMMER, K. N.; PATOLE, S. K. Probiotic supplementation and late-onset sepsis in preterm infants: a meta-analysis. **Pediatrics**, v. 137, p. 1-16, 2016.

RATHER, S. A.; AKHTER, R.; MASOODI, F. A.; GANI, A.; WANI, S. M. Effect of double alginate microencapsulation on in vitro digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297. **LWT — Food Science and Technology**, v. 83, p. 50-58, 2017.

RAZMPOOSH, E.; JAVADI, A.; EJTAHED, H. S.; MIRMIRAN, P.; MARYAM, J.; YOUSEFINEJAD, A. The effect of probiotic supplementation on glycemic control and lipid profile in patients with type 2 diabetes: A randomized placebo controlled trial. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 13, p. 175-182, 2019.

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

RINCON, L.; BOTELHO, R. B. A.; ALENCAR, E. R. Development of novel plant-based milk based on chickpea and coconut. **LWT - Food Science and Technology**, v. 128, p. 109479, 2020.

RODRIGUES, V. C. C.; DA SILVA, L. G. S.; SIMABUCO, F. M.; VENEMA, K.; ANTUNES, A. E. C. Survival, metabolic status and cellular morphology of probiotics in dairy products and dietary supplement after simulated digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 55, p. 126-134, 2019.

ROLIM, F. R. L.; FREITAS NETO, O. C.; OLIVEIRA, M. E. G.; OLIVEIRA, C. J. B.; QUEIROGA, R. C. R. E. Cheeses as food matrixes for probiotics: In vitro and in vivo tests. **Trends in Food Science and Technology**, v. 100, p. 138-154, 2020.

ROMÁN, G. C.; JACKSON, R. E.; GADHIA, R.; ROMÁN, A. N.; REIS, J. Mediterranean diet: The role of long-chain  $\omega$ -3 fatty acids in fish; polyphenols in fruits, vegetables, cereals, coffee, tea, cacao and wine; probiotics and vitamins in prevention of stroke, age-related cognitive decline, and Alzheimer disease. **Revue Neurologique**, v. 175, p. 724-741, 2019.

SABIKHI, L.; BABU, R.; THOMPSON, D. K.; KAPILA, S. Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. **Food Biopolymer Technology**, v.13, p. 586–593, 2010.

SALAMA, A.; HASANIN, M.; HESEMANN, P. Synthesis and antimicrobial properties of new chitosan derivatives containing guanidinium groups. **Carbohydrate Polymers**, v. 241, p. 116363, 2020.

SALVATORE, E.; PES, M.; FALCHI, G.; PAGNOZZI, D.; FURESI, S.; FIORI, M.; ROGGIO, T.; ADDIS, M. F.; PIRISI, A. Effect of whey concentration on protein recovery in fresh ovine ricotta cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 4686-4694, 2014.

SAMEER, B.; GANGULY, S.; KHETRA, Y.; SABIKHI, L. Development and Characterization of Probiotic Buffalo Milk Ricotta Cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 121, p. 108944, 2020.

SANCHES, V. L.; PEIXOTO, R. R. A.; CADORE, S. Phosphorus and zinc are less bioaccessible in soy-based beverages in comparison to bovine milk. **Journal of Functional Foods**, v. 65, p. 103728, 2020.

SANGWAN, S.; SINGH, R. Synergistic effect of oats and LGG fermented milk on lowering hypercholesterolemia in rats. **Journal of Cereal Science**, v. 82, p. 164-169, 2018.

SANT'ANA, A. M. S.; BEZERRIL, F. F.; MADRUGA, M. S.; BATISTA, A. S. M.; MAGNANI, M.; DE SOUZA, E. L.; QUEIROGA, R. C. R. E. Nutritional and sensory characteristics of Minas fresh cheese made with goat milk, cow milk, or a mixture of both. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 7442-7453, 2013.

SANT'ANA, A. M. S.; BESSA, R. J. B.; ALVES, S. P.; MEDEIROS, A. N.; COSTA, R. G.; DE SOUSA, Y. R. F.; BEZERRIL, F. F.; BATISTA, A. S. M.; MADRUGA, M. S.; QUEIROGA, R. C. R. E. Fatty acid, volatile and sensory profiles of milk and cheese from goats raised on native semiarid pasture or in confinement. **International Dairy Journal**, v. 91, p. 147-154, 2019.

SANTOS, P. P.; FLÔRES, S. H.; RIOS, A. O.; CHISTÉ, R. C. Biodegradable polymers as wall materials to the synthesis of bioactive compound nanocapsules. **Trends in Food Science and Technology**, v. 53, p. 23-33, 2016.

SANTURINO, C.; CALVO, M. V.; GÓMEZ-CANDELA, C.; FONTECHA, J. Characterization of naturally goat cheese enriched in conjugated linoleic acid and omega-3 fatty acids for human clinical trial in overweight and obese subjects. **Pharma Nutrition**, v. 5, p. 8-17, 2017.

SARAO, L. K.; ARORA, M. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, p. 337-344, 2017.

SATTIN, E.; ANDREANI, N. A.; CARRARO, L.; FASOLATO, L.; BALZAN, S.; NOVELLI, E.; SQUARTINI, A.; TELATIN, A.; SIMIONATI, B.; CARDAZZO, B. Microbial dynamics during shelf-life of industrial ricotta cheese and identification of a *Bacillus* strain as a cause of a pink discoloration. **Food Microbiology**, v. 57, p. 8-15, 2016.

SAUER, M.; RUSSMAYER, H.; GRABHERR, R.; PETERBAUER, C. K.; MARX, H. The efficient clade: lactic acid bacteria for industrial chemical production. **Trends in biotechnology**, v. 35, p. 756–769, 2017.

SELLE, K. M.; KLAENHAMMER, T. R.; RUSSELL, W. M. *Lactobacillus acidophilus*. **Encyclopedia of food microbiology**, p. 412-417, 2014.

SENKARCINOVA, B.; DIAS, I. A. G.; NESPOR, J.; BRANYIK, T. Probiotic alcohol-free beer made with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 100, p. 362–367, 2019.

SETHI, S.; TYAGI, S. K.; ANURAG, R. K. Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 3408-3423, 2016.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1262–127, 2007.

SHI, J.; ALVES, N. M.; MANO, J. F. Chitosan coated alginate beads containing poly (N-isopropylacrylamide) for dual-stimuli-responsive drug release. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 84, p. 595-603, 2008.

SHORI, A. B. The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 423-431, 2015.

SHORI, A. B. Microencapsulation improved probiotics survival during gastric transit **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 24, p. 1-5, 2017.

SHU, G.; WANG, Z.; CHEN, L.; WAN, H.; CHEN, H. Characterization of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* in goat milk powder and tablet: Optimization of the composite cryoprotectants and evaluation of storage stability at different temperature. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 70–76, 2018.

SILVA, F. F. P.; BISCOLA, V.; LEBLANC, J. G.; FRANCO, B. D. G. M. Effect of indigenous lactic acid bacteria isolated from goat milk and cheeses on folate and riboflavin content of fermented goat milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 155-161, 2016.

SILVA, A. R.; SILVA, M. M.; RIBEIRO, B. D. Health Issues and Technological Aspects of Plant-based Alternative Milk. **Food Research International**, p. 108972, 2020.

SILVA, J. G. S.; REBELLATO, A. P.; CARAMÊS, E. T. S.; GREINER, R.; PALLONE, J. A. L. In vitro digestion effect on mineral bioaccessibility and antioxidant bioactive

compounds of plant-based beverages. **Food Research International**, v. 130, p. 108993, 2020 a.

SILVA, J. M.; KLOSOSKI, S. J.; SILVA, R.; RAICES, R. S. L.; SILVA, M. C.; FREITAS, M. Q.; BARÃO, C. E.; PIMENTEL, T. C. Passion fruit-flavored ice cream processed with water-soluble extract of rice by-product: What is the impact of the addition of different prebiotic components? **LWT - Food Science and Technology**, v. 128, p. 109472, 2020 b.

SPERRY, M. F.; SILVA, H. L.; BALTHAZAR, C. F.; ESMERINO, E. A.; VERRUCK, S.; PRUDENCIO, E. S.; NETO, R. P. C.; TAVARES, M. I. B.; PEIXOTO, J. C.; NAZZARO, F.; ROCHA, R. S.; MORAES, J.; GOMES, A. S. G.; RAICES, R. S. L.; SILVA, M. C.; GRANATO, D.; PIMENTEL, T. C.; FREITAS, M. Q.; CRUZ, A. G. Probiotic Minas Frescal cheese added with *L. casei* 01: Physicochemical and bioactivity characterization and effects on hematological/biochemical parameters of hypertensive overweighted women—A randomized double-blind pilot trial. **Journal of Functional Foods**, v. 45, p. 435-443, 2018.

SRIAMORNSAKA, P.; NUNTHANIDA, J.; LUANGTANA-ANANA, M.; WEERAPOL, Y.; PUTTIPIPATKHACHORNC, S. Alginate-based pellets prepared by extrusion/spheronization: Effect of the amount and type of sodium alginate and calcium salts. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 227–235, 2008.

TANGYU, M.; MULLER, J.; BOLTEN, C. J.; WITTMANN, C. Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavor and nutritional value. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 103, p. 9263 – 9275, 2019.

TEJERO-SARINENA, S.; BARLOW, J.; COSTABILE, A.; GIBSON, G. R.; ROWLAND, I. Antipathogenic activity of probiotics against *Salmonella* Typhimurium and *Clostridium difficile* in anaerobic batch culture systems: is it due to synergies in probiotic mixtures or the specificity of single strains? **Anaerobe**, v. 24, p. 60-65, 2013.

TIMILSENA, Y. P.; WANG, B.; ADHIKARI, R.; ADHIKARI, B. Advances in microencapsulation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs)-rich plant oils using complex coacervation: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 369-381, 2017.

TRABELSI, I.; BEJAR, W.; AYADI, D.; CHOUAYEKH, H.; KAMMOUN, R.; BEJAR, S.; BEN, R. Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved the survival of newly probiotic in oxgall and gastric juice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 61, p. 36-42, 2013.

TRIBST, A. A. L.; FALCADE, L. T. P.; CARVALHO, N. S.; LEITE JUNIOR, B. R. C.; DE OLIVEIRA, M. M. Manufacture of a fermented dairy product using whey from sheep's milk cheese: an alternative to using the main by-product of sheep's milk cheese production in small farms. **International Dairy Journal**, v. 104833, 2020. DOI: 10.1016/j.idairyj.2020.104833

- TRIPATHY, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 225–241, 2014.
- VALERO-CASES, E.; FRUTOS, M. J. Effect of different types of encapsulation on the survival of *Lactobacillus plantarum* during storage with inulin and in vitro digestion. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p. 824-828, 2015.
- VANGA, S. K.; RAGHAVAN, V. How well do plant based alternatives fare nutritionally compared to cow's milk? **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, p. 10-20, 2018.
- VAZIRI, A. S.; ALEMZADEH, I.; VOSSOUGH, M. Improving survivability of *Lactobacillus plantarum* in alginate-chitosan beads reinforced by Na-tripolyphosphate dual cross-linking. **LWT - Food Science and Technology**, v. 97, p. 440-447, 2018.
- VERRUCK, S.; DANTAS, A.; PRUDENCIO, E. S. Functionality of the components from goat's milk, recent advances for functional dairy products development and its implications on human health. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 243–257, 2019.
- VIEITEZ, I.; IRIGARAY, B.; CALLEJAS, N.; GONZÁLEZ, V.; GIMENEZ, S.; ARECHA VALETA, A.; GROMPONE, M.; GÁMBARO, A. Composition of fatty acids and triglycerides in goat cheeses and study of the triglyceride composition of goat milk and cow milk blends. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 48, p. 95-101, 2016.
- WU, QX.; XU, X.; XIE, Q.; TONG, WY.; CHEN, Y. Evaluation of chitosan hydrochloride-alginate as enteric micro-probiotic-carrier with dual protective barriers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 665-671, 2016.
- YANG, Y.; CHUANG, C.; YANG, H.; LU, C.; SHEU, B. *Lactobacillus acidophilus* ameliorates H. pylori-induced gastric inflammation by inactivating the Smad7 and NFκB pathways. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 1-8, 2012.
- YAO, M.; WU, J.; LI, B.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J.; LI, L. Microencapsulation of *Lactobacillus salivarius* Li01 for enhanced storage viability and targeted delivery to gut microbiota. **Food Hydrocolloids**, v. 72, p. 228-236, 2017.
- YEUN, Y.; LEE, J. Effect of a double-coated probiotic formulation on functional constipation in the elderly: a randomized, double blind, controlled study. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, p. 1345-1350, 2015.
- YING, D.; SANGUANSRI, L.; WEERAKKODY, R.; BULL, M.; SINGH, T. K.; AUGUSTIN, M. A. Effect of encapsulant matrix on stability of microencapsulated probiotics. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 447–458, 2016.

YU, S.; XU, X.; FENG, J.; LIU, M.; HU, K. Chitosan and chitosan coating nanoparticles for the treatment of brain disease. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 560, p. 282–293, 2019.

ZANJANI, M. A. K.; TARZI, B. G.; SHARIFAN, A.; MOHAMMADI, N.; BAKHODA, H.; MADANIPOUR, M. M. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* with calcium alginate-resistant starch and evaluation of survival and sensory properties in cream-filled cake. **African Journal of Microbiology Research**, v.6, p. 5511-5517, 2012.

ZANJANI, M. A. K.; TARZI, B. G.; SHARIFAN, A.; MOHAMMADI, N. Microencapsulation of probiotics by calcium alginate-gelatinized starch with chitosan coating and evaluation of survival in simulated human gastro-intestinal condition. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR**, v. 13, p. 843, 2014.

ZEPPA, G.; CONTERNO, L.; GERBI, V. Determination of organic acids, sugars, diacetyl, and acetoin in cheese by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2722-2726, 2001.

ZHENG, J.; WITTOUCK, S.; SALVETTI, E.; FRANZ, C. M. A. P.; HARRIS, H. M. B.; MATTARELLI, P.; O'TOOLE, P. W.; POT, B.; VANDAMME, P.; WALTER, J.; WATANABE, K.; WUYTS, S.; FELIS, G. E.; GÄNZLE, M. G.; LEBEER, S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 20, p. 2782-2858, 2020.

ZOU, P.; YUAN, S.; YANG, X.; GUO, Y.; LI, L.; XU, C.; ZHAI, X.; WANG, J. Structural characterization and antitumor effects of chitosan oligosaccharides against orthotopic liver tumor via NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Journal of Functional Foods**, v. 57, p. 157-165, 2019.

## APÊNDICE A - FORMULÁRIO DO TESTE DE ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA DO CREME DE RICOTA CAPRINO

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

### Teste de Aceitação e Intenção de compra

**Nome:** \_\_\_\_\_ **Idade:** \_\_\_\_\_ **email:** \_\_\_\_\_  
**Fone:** \_\_\_\_\_ **Escolaridade:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_\_

Você está recebendo 04 amostras codificadas de pasta de ricota caprina com potencial probiótico. Prove-as da esquerda para direita, avalie sensorialmente as amostras de acordo com cada atributo nos quadros e escreva o valor da escala que você considera correspondente à amostra (código) no que diz respeito aos atributos avaliados. Antes de cada avaliação, você deverá fazer uso da água e da bolacha.

- 9 – gostei muitíssimo
- 8 – gostei muito
- 7 – gostei moderadamente
- 6 – gostei ligeiramente
- 5 – nem gostei/nem desgostei
- 4 - desgostei ligeiramente
- 3 – desgostei moderadamente
- 2 – desgostei muito
- 1 – desgostei muitíssimo

<b>ATRIBUTOS</b>	<b>AMOSTRAS (CÓDIGO)</b>			
<b>Aparência</b>				
<b>Cor</b>				
<b>Aroma</b>				
<b>Sabor</b>				
<b>Textura</b>				
<b>Impressão Global</b>				

Agora indique sua atitude ao encontrar estes produtos no mercado.

- 5 – compraria
- 4 – possivelmente compraria

<b>ATRIBUTOS</b>	<b>AMOSTRAS (CÓDIGO)</b>

3 – talvez comprasse/ talvez não comprasse

2 – possivelmente não compraria

1 – jamais compraria

<b>Intenção de Compra</b>				

Comentários: \_\_\_\_\_

Obrigada!

## APÊNDICE B - FORMULÁRIO DO TESTE DE ORDENAÇÃO-PREFERÊNCIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

### Teste de Ordenação-Preferência

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Você está recebendo 4 amostras de pasta de ricota caprina com potencial probiótico. Por favor, prove as amostras, da esquerda para direita, e ordene-as em **ordem decrescente de preferência geral**. Espere 30 segundos antes de consumir a próxima amostra e utilize bolacha e água entre cada avaliação.

	Mais Preferida	→		Menos Preferida
Posto	1º Lugar	2º Lugar	3º Lugar	4º Lugar
Código				

Comentários: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Agora, por favor, responda as seguintes questões:**

1. Qual característica sensorial você **mais apreciou** na amostra mais preferida?

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

2. Qual característica sensorial você **não apreciou** na amostra menos preferida?

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Comentários: \_\_\_\_\_

Obrigada!

## APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



### UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) na análise sensorial da pesquisa “DESENVOLVIMENTO DE PASTA DE RICOTA CAPRINA COM PROBIÓTICOS MICROENCAPSULADOS”, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Laênia Angélica Andrade Lopes, residente na Rua João Vieira Carneiro nº 895, apt 703 no Bairro Pedro Gondim, cep 58031080, João Pessoa-PB. Telefone do pesquisador responsável (83) 996737883 (inclusive ligações a cobrar) e email: laenia.lopes@gmail.com. A pesquisa está sob a orientação da Profa. Dra. Thayza Christina Montenegro Stamford, email: thayzastamford29@gmail.com, Telefone: (81) 985774611 e co-orientação da Profa. Dra. Marciane Magnani, email: magnani2@gmail.com, telefone para contato: (83) 996866833.

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo, pedimos que rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável. Você estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

#### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Esta pesquisa é sobre a elaboração e caracterização de uma pasta de ricota produzida com leite de cabra e adicionada do probiótico *L. acidophilus* La-05 (micro-organismo que oferece benefícios ao organismo) em microcápsulas de alginato e quitosana (substâncias seguras para consumo).

A sua participação nesta pesquisa ocorrerá da seguinte forma:

- a) Cada participante receberá 4 amostras de pasta de ricota de cabra. O procedimento terá o tempo de duração de aproximadamente 10 minutos para a degustação.
- b) As amostras deverão ser provadas individualmente e, entre elas, o participante deverá beber água filtrada para lavagem da boca e neutralização do paladar.
- c) O participante receberá dois formulários de avaliação para preencher as informações sobre cada amostra.

A sua participação poderá envolver riscos ou desconfortos pela falta de hábito de consumir queijo caprino, além de riscos inerentes à contaminação da pasta de ricota. Porém, esses riscos serão controlados adotando-se procedimentos seguros para manipulação e armazenamento dos mesmos. A bactéria probiótica e os materiais usados na pesquisa foram adquiridos comercialmente, e são seguros para consumo. Serão garantidos todos os cuidados necessários à participação de acordo com os direitos individuais e respeito ao bem estar físico e psicológico. Só deve participar desta pesquisa quem for consumidor habitual de queijo e pessoas que não sejam alérgicos ao leite e intolerantes a lactose. Preveem-se como benefícios da realização da pesquisa: elaboração de um produto que tenha boa qualidade nutricional; conhecer a aceitabilidade do produto; facilitar a inserção no mercado de novos produtos; verificar se o consumidor teria interesse em adquirir os produtos através dos resultados obtidos na ficha de intenção de compra. Dentre os benefícios diretos aos participantes, ter-se-á a contribuição para melhor aporte de proteínas, compostos bioativos e bactéria probiótica que pode oferecer benefícios ao organismo.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo,

sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados através de formulários nesta pesquisa, ficarão armazenados em pastas de arquivo e computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora Laênia Angélica Andrade Lopes, no endereço acima informado, pelo período de mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (**Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br**).

---

(assinatura do pesquisador)

### CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo “Desenvolvimento de Pasta de Ricota Caprina com Probióticos Microencapsulados” como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Local e data \_\_\_\_\_

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

**Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar.** (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

## APÊNDICE D - ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO FOOD RESEARCH INTERNATIONAL (ISSN 0963-9969)

13/05/2020

Rightslink® by Copyright Clearance Center



RightsLink®



Home



Help



Email Support



Sign in



Create Account



### Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-05 and incorporation in vegan milks: Physicochemical characteristics and survival during storage, exposure to stress conditions, and simulated gastrointestinal digestion

**Author:**

Laênia Angélica Andrade Lopes, Rafaela de Siqueira Ferraz Carvalho, Nereide Stela Santos Magalhães, Marta Suely Madruga, Ana Julia Alves Aguiar Athayde, Isabella Araújo Portela, Carlos Eduardo Barão, Tatiana Colombo Pimentel, Marciane Magnani et al.

**Publication:** Food Research International**Publisher:** Elsevier**Date:** September 2020

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>



## Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-05 and incorporation in vegan milks: Physicochemical characteristics and survival during storage, exposure to stress conditions, and simulated gastrointestinal digestion



Laênia Angélica Andrade Lopes<sup>a</sup>, Rafaela de Siqueira Ferraz Carvalho<sup>b</sup>,  
Nereide Stela Santos Magalhães<sup>b</sup>, Marta Suely Madruga<sup>c</sup>, Ana Julia Alves Aguiar Athayde<sup>a</sup>,  
Isabella Araújo Portela<sup>d</sup>, Carlos Eduardo Barão<sup>e</sup>, Tatiana Colombo Pimentel<sup>e</sup>,  
Marciane Magnani<sup>d,\*</sup>, Thayza Christina Montenegro Stamford<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos, Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Análise Química de Alimentos (LAQA), Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

<sup>d</sup> Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

<sup>e</sup> Instituto Federal do Pará, Campus Parauapebas, Parauapebas, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Probiotic  
Biopolymers  
Encapsulation  
*In vitro* digestion  
Freeze-drying  
Rice milk  
Soybean milk

### ABSTRACT

The effect of microencapsulation of *L. acidophilus* La-05 (8 log CFU/mL) by external ionic gelation technique in alginate (30 g/L; AM) and alginate coated with a low molecular weight chitosan solution (5 g/L; AC5M) on the survival of the freeze-dried probiotic culture during storage (7 °C; 0, 7, 15, 30, 60, 90 and 120 days), and exposure to temperature (72, 85 and 90 °C), pH (2, 4, and 6), and NaCl (10, 15 and 20 g/L) were studied. Furthermore, vegan milks (soybean and rice milks) added with microencapsulated probiotic cultures were evaluated for the physicochemical characteristics and survival of the probiotic culture during refrigerated storage (7 °C; 7 days) and *in vitro* digestion. Free cells were used as control. AM and AC5M showed similar microencapsulation yield (> 90%) with uniform and spherical microparticles dispersed without agglomeration. Scanning electron microscopy showed that chitosan was able to cover the porous structure of the alginate particles, resulting in a more stabilized microparticle. The microencapsulation provided higher probiotic protection to storage, thermal treatment, NaCl and pH (decreases of ~1 log CFU/mL) compared to the free cells (decreases of ~3, 4, 2 and 3 log CFU/mL, respectively), and increased probiotic survival during refrigerated storage and *in vitro* digestion of vegan milks compared to free cells (decreases of ~1 and 4 log CFU/mL, respectively). Only microencapsulated probiotic cultures (AM and AC5M) maintained suitable probiotic counts (> 6 log CFU/mL) during storage, exposure to stress conditions and simulated gastrointestinal digestion. Chitosan coating increased the probiotic survival in the vegan milks during refrigerated storage. Microencapsulation by external ionic gelation in alginate proved to be a suitable microencapsulation technique to improve the probiotic survival to storage, stress conditions (temperature, pH and NaCl) and simulated gastrointestinal conditions. This was the first study that evaluated the addition of probiotic cultures to rice and soybean milks, proving that the vegan milks could be considered suitable carriers for microencapsulated probiotic cultures.

### 1. Introduction

Probiotics are defined as live microorganisms that, when ingested in adequate quantities, confer health benefits to the host (Hill et al., 2014), being *L. acidophilus* La-05 a well-known probiotic strain (Kerry et al., 2018). To produce the desired effects on the health, the probiotic

culture needs to arrive metabolically viable in the gut (Silva, Cezarino, Michelson, & Sato, 2018). However, the probiotic microorganism in its free form may be susceptible to environmental stresses (oxygen, acid pH, and digestive enzymes) and drastically decrease its counts through the gastrointestinal tract (Rather, Akhter, Masoodi, Gani, & Wani, 2017).

\* Corresponding author.

E-mail address: [magnani2@gmail.com](mailto:magnani2@gmail.com) (M. Magnani).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109295>

Received 25 March 2020; Received in revised form 2 May 2020; Accepted 4 May 2020

Available online 07 May 2020

0963-9969/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The microencapsulation of probiotic cultures has been proposed to protect the microorganisms from the hostile conditions, allowing a greater number of viable cells to arrive in the gut (Ashwar, Gani, Gani, Shah, & Masoodi, 2018). In addition, microencapsulation prevents the strains from interacting with the matrix, reducing their impact on the sensory properties of the products (Liu et al., 2017). Among the techniques used for microencapsulation of probiotic cultures, external ionic gelation is the most popular, because it needs simple and accessible conditions for microparticles production and does not use high temperature or solvent (Poletto et al., 2019).

Sodium alginate is largely used in microencapsulation of probiotic cultures because of its biocompatible and biodegradable nature (Étchepare et al., 2016; Rather et al., 2017). However, the porous nature of the alginate gel may allow moisture, gastric juice and other fluids to enter the microparticle, reducing the protection against adverse environmental factors (Liu et al., 2017). Thus, materials such as chitosan have been used to coat the alginate microparticle in order to make it less porous and more stable (Étchepare et al., 2016; Rather et al., 2017).

In recent years, there was an increase in the veganism, as well as, a reduction of dairy products consumption, mainly because of the hypercholesteremic, milk-allergic, and lactose intolerant individuals. Therefore, vegetable matrices have been suggested as potential carriers for probiotic cultures, such as fermented soybean milks (Espírito-Santo et al., 2014), fermented rice milks (Costa, Júnior, Rosa, Caliani, & Pimentel, 2017), rice puddings (Abdel-Latif & Saad, 2016) and fermented coconut/soybean ice creams (Aboufazi, Baba, & Misran, 2015). Fermented products are the main non-dairy products evaluated, because fermentation increases the probiotic viability and survival, while the inclusion of probiotic cultures in non-fermented vegetable matrices could impair the probiotic survival (Min, Bunt, Mason, & Hussain, 2018). As far as the authors know there are no studies that evaluated the incorporation of free and microencapsulated *L. acidophilus* probiotic culture in rice and soybean milk.

This study aimed to evaluate the effect of microencapsulation of *L. acidophilus* La-05 by external ionic gelation technique in alginate and alginate coated with a low molecular weight chitosan solution on the survival of the probiotic culture: (1) during storage and exposure to temperature, pH, and NaCl, and (2) to the refrigerated storage and *in vitro* digestion when incorporated in vegan milks (soybean and rice milks). The effect of the probiotic addition on the physicochemical characteristics of the vegan milks was also evaluated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganisms and culture conditions

A commercial probiotic culture of *L. acidophilus* La-05 was obtained from Chr. Hansen Brazil (Valinhos, São Paulo, Brazil). Stock cultures were maintained in cryovials at  $-20^{\circ}\text{C}$  in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (HiMedia, Mumbai, India) containing glycerol (20 mL/100 mL, Sigma Aldrich, St. Louis, USA). The inoculum of the strain was obtained after preparing suspensions in sterile saline solution (8.5 g/L NaCl) and incubating at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 h under anaerobic conditions (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid Ltda., Wade Road, UK). Cultures were harvested by centrifugation (4500 g, 15 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ), washed twice with sterile saline solution and re-suspended to obtain standard cell suspensions. Optical density reading of 1.8 at 660 nm provided cell counts of approximately  $9 \log \text{CFU/mL}$ . The cell suspension was used in the assays as free cells or subjected to microencapsulation.

### 2.2. Microencapsulation of *L. Acidophilus* La-05

The microencapsulation of *L. acidophilus* La-05 was performed by external ionic gelation through extrusion (De Prisco, Maresca, Ongeng, & Mariello, 2015). The Encapsulator B-395 Pro was equipped with a

syringe pump and a 300 mm nozzle (BÜCHI Labortechnik, Flawil, Suíça). *L. acidophilus* La-05 pellet was incorporated into 50 mL of 30 g/L sterile ( $121^{\circ}\text{C}$  for 15 min) sodium alginate solution (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). A syringe was loaded with the suspension of sodium alginate and *L. acidophilus* La-05 and injected on the Encapsulator. Flow rate was adjusted to 26 mL/min with turbo with a vibration frequency of 1740 Hz and an electrode tension of 980 mV. The alginate cell suspension was dropped into 500 mL of a 0.5 mol/L calcium chloride solution and carefully stirred for 40 min. *L. acidophilus* La-05 loaded microparticles (AM) were washed, leached and maintained in sterile distilled water at  $7^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3. Coating of alginate microparticles with chitosan

Calcium alginate microparticles (AM) were coated with a low molecular weight chitosan (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) at 5 g/L (AC5M). The concentration of chitosan was based on preliminary tests, as the microencapsulation yield decreased significantly with the increase of chitosan content. The chitosan was dissolved in lactic acid solution (0.09 mol/L) under stirring at 120 rpm for 20 min, the pH was adjusted to 5.7–6.0 using 1 mol/L NaOH, and the solution was autoclaved at  $121^{\circ}\text{C}$  for 15 min. Coating of AM with chitosan was achieved by adding one gram of AM in 10 mL of the chitosan solution and gently stirring at 100 rpm for 15 min. Then, AC5M microparticles were filtered, washed, leached and maintained in sterile distilled water at  $7^{\circ}\text{C}$ .

### 2.4. Freeze-drying of the *L. Acidophilus* La-05 microparticles

AM and AC5M (1 g) and free cells (1 mL) of *L. acidophilus* La-05 were placed in cryotubes containing 10 mL of 100 g/L skim milk solution (Acumedia). The samples were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 24 h. Then, the cryotubes were placed at the freeze-dryer (Liotop L101 freeze-dryer, São Carlos, Brazil) for 48 h.

### 2.5. Characterization of microparticles

The morphology of the microparticles was observed in an Optical Microscopy Zeiss Axio (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Germany) coupled to a digital camera Axio-Cam HRC at 25x magnification. The particle size distribution was determined by span factor (Cai et al., 2014, Equation (1)) using a Microtrac particle analyser S3500 (Microtrac Inc., USA), and the results expressed as volume weighted mean diameter ( $\mu\text{m}$ ).

$$\text{Span} = [(d_{90}, 90) - (d_{10}, 10)] / (d_{50}, 50) \quad (1)$$

where  $(d_{10}, 10)$ ,  $(d_{50}, 50)$ ,  $(d_{90}, 90)$  corresponds to the diameters at which the cumulative sample volumes were under 10%, 50% and 90%, respectively.

The microstructure of the microcapsules was evaluated by scanning electron microscopy (SEM). For that, the microcapsules were deposited over a commercial double coated adhesive tape and attached to a stub. Then, they were coated with gold in a sputter coater (SCD 050, Bal-Tec, Wetzlar, Germany). Before critical point drying, the samples were transferred to microporous specimen capsules. The specimens were viewed with a SEM (Quanta 250, Thermo Fisher Scientific-FEI, Waltham, MA, USA) at an acceleration voltage of 15 kV.

### 2.6. Microencapsulation yield of *L. Acidophilus* La-05

The microencapsulation yield (Eq. (2)) was determined according to Chávarri et al. (2010), with minor modifications. Briefly, 0.1 g of probiotic microparticles were re-suspended in 1 mL sterile saline solution (8.5 g/L) and stirred with sodium citrate solution (10 g/L) at 1800 rpm for 10 min to disruption. Then, they were serially diluted ( $10^{-1}$ – $10^{-8}$ ), and 20  $\mu\text{L}$  aliquots of each dilution were inoculated on MRS agar using a microdrop inoculation technique (Herigstad, Hamilton, & Heersink,

2001). The plates were incubated at 37 °C for 48 h under anaerobiosis and visible colonies were enumerated. The results were expressed as log CFU/mL and the detection limit was 2 log CFU/mL. This procedure was used for all subsequent analysis of probiotic viability.

$$\text{Microencapsulation yield} = (N/N_0) \times 100 \quad (2)$$

where,  $N_0$  is the log cell number added in the sodium alginate solution and  $N$  is the log cell number loaded in the microparticles.

#### 2.7. Viability of *L. Acidophilus* La-05 in freeze-dried microparticles during storage

The viability of freeze-dried *L. acidophilus* La-05 (free, AM or AC5M) was evaluated during storage for 0, 7, 15, 30, 60, 90 and 120 days at 7 °C.

#### 2.8. Viability of *L. Acidophilus* La-05 in freeze-dried microparticles under stress conditions

The exposure to heat treatment was performed as suggested by Alves et al. (2015). First, 0.1 g of probiotic culture were added with 1 mL sterile distilled water, exposed to temperatures of 72, 85 and 90 °C for 30 s, and instantly cooled in ice for 10 min. The tolerance to NaCl was verified according to the methodology proposed by Sabikhi, Babu, Thompkinson, and Kapila (2010). To do this, 0.1 g of probiotic culture were added with 1 mL sterile saline solution containing 10, 15, or 20 g/L NaCl and incubated at 37 °C for 1, 2, and 3 h. The tolerance to pH was tested according to the methodology described by Castro-Cislaghi, Reis, Fritzen-Freire, Lorenz, & Sant'Anna (2012), with modifications. For that, 0.1 g of probiotic culture were added with 1 mL sterile distilled water, exposed to pH 2.0, 4.0 and 6.0 adjusted with 5 mol/L HCl or with 1 mol/L NaOH, and incubated at 37 °C for 1, 2, and 3 h. The probiotic viability was performed at each interval of exposure to stress conditions.

#### 2.9. Physicochemical characteristics and probiotic survival in vegan milks during refrigerated storage and *in vitro* digestion

Soybean and rice were obtained in the local commerce of João Pessoa city, Paraíba State, Brazil. Milks were produced according to the methodology proposed by He, Guo, and Zhu (2019), with some alterations. Briefly, 100 g of grains were soaked in 200 mL of water for 12 h at 7 °C. Subsequently, the grains were blended with 600 mL of water and heated at 90 °C for 25 min. Then, the vegan milks were filtered with a stainless-steel sieve with 120 mesh. Finally, 2.5 g of the freeze-dried AM, AC5M or free cells were incorporated in sterile glass flasks (50 mL) containing 25 mL soybean milk or rice milk, and the vegan milks stored for 7 days at 7 °C. Distilled water inoculated with probiotic culture was used as control. After zero, 2 and 7 days of storage microparticles were disrupted and cells enumerated. The shelf life was

based on that of pasteurized milk.

The total soluble solids (TSS), pH and color of the vegan milks were determined on days 0 and 7 of storage using standard procedures (AOAC, 2016). TSS content was determined in a digital refractometer (Instruterm®, São Paulo, Brazil) and expressed as °Brix. (Method 932.12). pH measured using a digital potentiometer (MS Tecnonop Instrumentation, mPA210, Piracicaba, Brazil) (Method 981.12). A colorimeter (Minolta®, model CR400, Osaka, Japan) was used for color evaluation. The equipment provided the parameters  $L^*$  (brightness),  $a^*$  (red-green component) and  $b^*$  (yellow-blue component).

To assess the survival under simulated gastrointestinal conditions, the *in vitro* digestion was performed according to Madureira, Amorim, Gomes, Pintado, and Malcata (2011) in a continuous process simulating digestion in the esophagus-stomach, duodenum, and ileum. Enzymes and bile salts (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) were sterilized with sterile membrane filter of 0.22 µm (Millipore, Billerica, MA, EUA) and maintained in an ice bath. To simulate the esophagus-stomach, a pepsin solution (25 mg/mL diluted in 0.1 mol/L HCl) was added at a rate of 0.05 mL/mL for 90 min, and the pH was gradually reduced using 1 mol/L HCl. The duodenum was simulated adding pancreatin solution (1 g/L prepared in 0.1 mol/L NaHCO<sub>3</sub>) and bile salts (6 g/L prepared in 0.1 mol/L NaHCO<sub>3</sub>) at a proportion of 0.25 mL/mL and adjusting the pH to 5.0 using 0.1 mol/L NaHCO<sub>3</sub>. In the last step, the ileum was simulated with pH adjustment to 6.5 with 0.1 mol/L NaHCO<sub>3</sub>. The mechanical agitation to simulate peristaltic movements and the temperature at 37 °C to simulate the human body temperature were realized in an incubator (TE-424 TECNAL, Orbital Shaker Incubadora, São Paulo, SP, Brasil) with rotational adjustment in each phase. After each simulated gastrointestinal step, the enumeration of viable counts was performed.

#### 2.10. Statistical analysis

Data were expressed as average ± standard deviation of two independent experiments (repetitions) in triplicate. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were determined by ANOVA and Tukey's test using the software Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, California).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Characterization of microparticles, microencapsulation yield and freeze-drying process

The microparticles (AM and AC5M) presented spherical and uniform shape and integrity, as well dispersion without agglomeration (Fig. 1). From SEM images, it could be observed that the alginate microparticles (AM) were rough with folds and cavities and presented a more porous structure (Fig. 2). The incorporation of chitosan in the

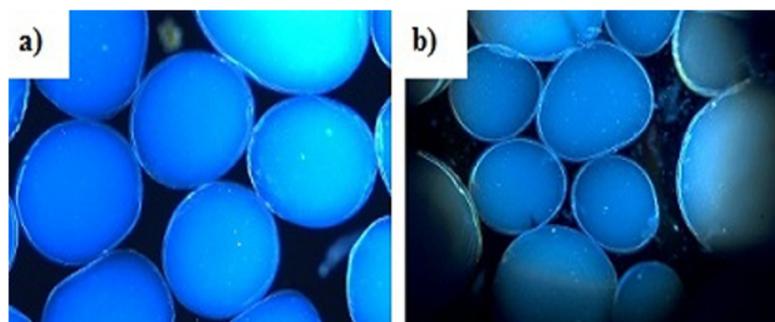


Fig. 1. Optical microscopy images of microparticles at × 25 magnification: a) Calcium alginate microparticles b) Calcium alginate microparticles coated with chitosan.

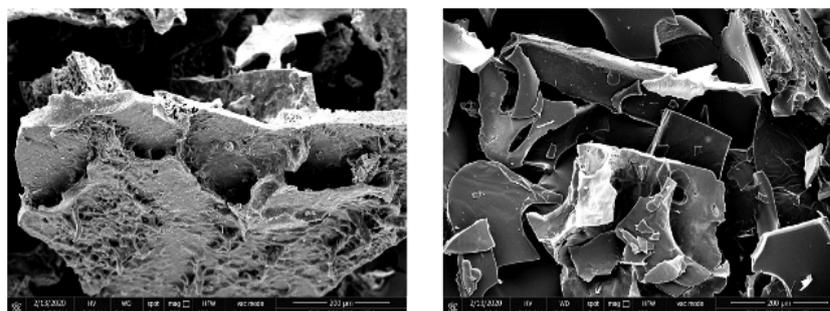


Fig. 2. Scanning electron microscopy (SEM) images of microparticles at  $\times 500$  magnification: a) Calcium alginate microparticles b) Calcium alginate microparticles coated with chitosan.

alginate coating (AC5M) resulted in a less porous and more stable structure. This result could be associated with the interactions between oppositely charged polymers of chitosan and alginate, resulting in a stabilized microparticle (Shi, Alves, & Mano, 2008, Jiang et al., 2014). Chitosan coating can decrease the alginate permeability by providing a strong and thick membrane, resulting in a more compact and denser microcapsule (Vaziri, Alemzadeh, & Vossoughi, 2018). Therefore, chitosan was able to cover the porous beads of alginate, which could increase the protection of the probiotic culture (Ansari, Pourjafar, Jodat, Sahebi, & Ataei, 2017).

The microparticles presented size in the range of 793–891  $\mu\text{m}$ , which is interesting for food applications. The size of the particles in the micron range can provide a smooth texture to the food product, while particles in millimeter size can provide gritty texture (Zanjani et al., 2012). Furthermore, particles with size higher than 100  $\mu\text{m}$  are needed to offer protection for probiotic cultures during simulated gastrointestinal conditions (Zanzani, Tarzi, Sharifan, & Mohammadi, 2014).

The incorporation of chitosan in the alginate coating (AC5M) resulted in an increase ( $p < 0.05$ ) in the mean particle diameter ( $891.43 \pm 50.92 \mu\text{m}$ ) and expansion factor ( $1.39 \pm 0.02$ ) compared to the alginate coating (AM,  $793.93 \pm 10.81 \mu\text{m}$  and  $0.97 \pm 0.08$ , respectively). Therefore, the microparticle coated with chitosan presented a higher and less uniform diameter. In fact, when chitosan is incorporated as a coating, a denser and thicker outer membrane is produced (Nualkaekul, Lenton, Cook, Khutoryanskiy, & Charalampopoulos, 2012). The freeze-drying process resulted in a decrease in the particle diameter from  $793.93 \pm 10.81$  to  $740.60 \pm 13.18 \mu\text{m}$  for AM and from  $891.43 \pm 50.92 \mu\text{m}$  to  $865.80 \pm 28.58 \mu\text{m}$  for AC5M ( $p < 0.05$ ), with no significant difference between microparticles ( $p > 0.05$ ). This effect can be attributed to the water loss during the freeze-drying process. Furthermore, freeze drying process can result in agglomeration, and loss of spherical shape, resulting in decreases in the particle size (Etchepare et al., 2016).

The results of the characterization of the microparticles suggest that alginate and alginate-chitosan microparticles present spherical and uniform shape and integrity, with no agglomeration, when analyzed using an optical microscopy. The utilization of SEM provided a more detailed information, demonstrating that chitosan was able to cover the porous structure of the alginate particles, resulting in a more stabilized microparticle. Consequently, alginate-chitosan particles presented a higher mean diameter particle and expansion factor.

Table 1 presents the viable cells count before and after microencapsulation of *L. acidophilus* La-05, and microencapsulation yield. The probiotic count before encapsulation was 8.16–8.24 CFU/mL and, after encapsulation, cell counts ranged between 8.09 and 8.10 CFU/mL for the microparticles and 7.57–7.65 CFU/mL for the freeze-dried microparticles (Table 1). Furthermore, high cell entrapment ( $> 90\%$ ) was achieved. The high microencapsulation yield shows that the microencapsulation process was appropriate, and the alginate and chitosan were compatible. In addition, the probiotic counts suggest that the

Table 1  
Viable cells count before and after microencapsulation of *L. acidophilus* La-05 and microencapsulation yield.

Microparticle type	Viable cell counts (log CFU/mL)		Microencapsulation yield (%)
	Initial number of cells	Number of cells microencapsulated	
AM	$8.16 \pm 0.03^a$	$8.09 \pm 0.02^a$	$99.27 \pm 0.59^a$
AC5M	$8.20 \pm 0.04^a$	$8.10 \pm 0.02^a$	$99.33 \pm 0.15^a$
Freeze-dried AM	$8.23 \pm 0.02^a$	$7.65 \pm 0.08^b$	$92.68 \pm 1.12^b$
Freeze-dried AC5M	$8.24 \pm 0.01^a$	$7.57 \pm 0.06^b$	$91.87 \pm 0.91^b$

AM: Calcium alginate microparticles; AC5M: Calcium alginate microparticles coated of chitosan with concentration 5 g/L. a–c: different superscript letters in the same column denote differences ( $p < 0.05$ ) in the microencapsulation yield in different microparticle type, according to the Tukey's test.

probiotic cultures did not suffer damage during the process of microencapsulation, demonstrating that external ionic gelation in alginate technique was an adequate and feasible technology to produce the probiotic microcapsules (Holkem et al., 2016). The incorporation of chitosan in the alginate coating (AC5M) did not have an effect on the number of cells microencapsulated or in the microencapsulation yield ( $p > 0.05$ ). In fact, coating methods generally do not have an effect on the probiotic viability in the microparticles (Darjani, Nezhad, Kadkhodae, & Milani, 2016).

The freeze-drying process resulted in a reduction  $< 1$  log CFU/mL in the probiotic cells. Freeze-drying is considered one of the main technologies used to obtain dry probiotic products, since it avoids oxidative stress and thermal damage in cells. However, it can result in decreases in the probiotic survival after its application (Guedes et al., 2019). The freeze-dried microparticles presented probiotic counts higher than 7 log CFU/mL, demonstrating that the microencapsulation by external ionic gelation technique in alginate and alginate/chitosan was a suitable methodology, presenting high microencapsulation yield ( $> 90\%$ ).

### 3.2. Viability of *L. Acidophilus* La-05 in freeze-dried microparticles during storage

Table 2 presents the viability of the freeze-dried *L. acidophilus* La-05 during refrigerated storage. The probiotic counts of the free cells decreased approximately 1.8, 2.89 and 3.57 log CFU/mL after 30, 60 and 120 days of refrigerated storage (Table 2). On the other hand, the microencapsulated probiotic counts decreased  $\sim 1$  log CFU/mL in freeze-dried AM and AC5M and only after 90 days of storage ( $p < 0.05$ ). Therefore, the microencapsulation of the probiotic culture (AM or AC5M) resulted in improved survival of the *L. acidophilus* La-05 during 120 days of storage ( $p < 0.05$ , Table 2). These results could be related

**Table 2**  
Counts (log CFU/mL) for microencapsulated *L. acidophilus* La-05 freeze-dried during 120 days of refrigerated storage (7 °C).

Samples	Time (days)							
	0	7	15	30	60	90	120	
Free cells	7.44 ± 0.08 <sup>ab</sup>	7.31 ± 0.09 <sup>ab</sup>	6.68 ± 0.04 <sup>cd</sup>	5.55 ± 0.09 <sup>cd</sup>	4.87 ± 0.04 <sup>ab</sup>	4.55 ± 0.02 <sup>cd</sup>	3.87 ± 0.05 <sup>cd</sup>	
AM	7.69 ± 0.13 <sup>ab</sup>	7.44 ± 0.01 <sup>ab</sup>	7.33 ± 0.12 <sup>ab</sup>	7.00 ± 0.01 <sup>ca</sup>	6.78 ± 0.02 <sup>ca</sup>	6.66 ± 0.16 <sup>ca</sup>	6.59 ± 0.11 <sup>ca</sup>	
ACSM	7.57 ± 0.07 <sup>ab</sup>	7.50 ± 0.12 <sup>ab</sup>	6.89 ± 0.02 <sup>ab</sup>	6.87 ± 0.02 <sup>ab</sup>	6.70 ± 0.17 <sup>ca</sup>	6.46 ± 0.18 <sup>cd</sup>	6.27 ± 0.09 <sup>cd</sup>	

AM: Calcium alginate microparticles; ACSM: Calcium alginate microparticles coated of chitosan with concentration 5 g/L. a–g: different superscript letters in the same row denote differences ( $p < 0.05$ ) between the same sample in the different times during storage, according to the Tukey's test. A–C: different capital letters in the same column denote differences ( $p < 0.05$ ) between the different samples in the same time during storage, according to the Tukey's test.

to the ability of alginate gel and chitosan coating to form a physical barrier against stress conditions, preserving the viability of probiotics during storage (De Prisco, Maresca, Ongeng, & Mauriello, 2015; Etchepare et al., 2016). In a general view, there was no protective effect on the probiotic survival of the incorporation of chitosan in the alginate microparticle ( $p > 0.05$ ).

The minimum suggested counts for probiotic products should be over 6 log CFU/mL (Guedes et al., 2019). In this way, freeze-dried *L. acidophilus* La-05 could be considered probiotic during 15 days of refrigerated storage for the free cells and 120 days for the microencapsulated cells (AM and ACSM). Therefore, microencapsulation improved the shelf life of the freeze-dried cells in at least 115 days. This result is very important for the industries that commercialize freeze-dried probiotic cultures.

### 3.3. Viability of *L. Acidophilus* La-05 in freeze-dried microparticles during exposure to stresses

Table 3 presents the viability of the freeze-dried *L. acidophilus* La-05 during exposure to stress conditions. Freeze-dried *L. acidophilus* La-05 free cells decreased ( $p < 0.05$ ) up to ~ 4 log CFU/mL after thermal treatments (Table 3). As expected, the reduction in viable cells increased with the increase in the temperature. Otherwise, *L. acidophilus* La-05 in AM and ACSM decreased < 1 log CFU/mL after all tested thermal treatments (Table 3). This is an important result because one of the major factors that determine the use of probiotic cultures in food processing is the thermal resistance (Verruck, Dantas, & Prudencio, 2019). Free cells were not able to survive to any heat treatment in suitable counts (> 6 log CFU/mL). However, in both tested microparticles, the probiotic maintained the suitable viability (> 6 log CFU/mL) indicating feasibility for incorporation in products subjected to heat treatment. No differences ( $p > 0.05$ ) were observed between AM and ACSM, regardless the exposure time or temperature tested. Therefore, there was no impact of chitosan coating on the heat resistance of the probiotic culture ( $p > 0.05$ ).

Freeze-dried *L. acidophilus* La-05 free cells decreased ( $p < 0.05$ ) in the range of 1 to 2.5 log CFU/mL after exposure to NaCl (Table 3); the viability decreased as the NaCl concentration increased ( $p < 0.05$ ). For *L. acidophilus* La-05 in AM and ACSM, decreases ( $p < 0.05$ ) < 1 log CFU/mL was observed (Table 3). NaCl is an ever-present ingredient in food manufacturing, however, in probiotic products, the added salt concentration may compromise the cell viability of the strain, as the survival of the probiotic strain in the presence of NaCl is affected by the reduction of water activity and increase of the osmolarity (Sabikhi et al., 2010). Free cells were able to survive in suitable counts (> 6 log CFU/mL) after exposure to NaCl at 10 and 15 g/L but presented lower counts (5.09–5.74 CFU/mL) at 20 g/L for 2 or 3 h. In both tested microparticles, the probiotic maintained the suitable viability (> 6 log CFU/mL) at all concentrations and times indicating feasibility for incorporation in products added with up to 20 g/L of NaCl. No differences ( $p > 0.05$ ) were observed between AM and ACSM, regardless the exposure time or NaCl concentration.

Freeze-dried *L. acidophilus* La-05 free cells decreased ( $p < 0.05$ ) in

**Table 3**  
Counts (log CFU/mL) for microencapsulated *L. acidophilus* La-05 freeze-dried during exposure to different stress conditions.

Exposure to stresses	Time (h)	Viable cell counts (log CFU/mL)		
		Free cells	AM	ACSM
Temperature	Non-treated	7.71 ± 0.02 <sup>aa</sup>	7.69 ± 0.01 <sup>aa</sup>	7.70 ± 0.01 <sup>aa</sup>
72 °C	–	5.50 ± 0.08 <sup>bb</sup>	7.62 ± 0.01 <sup>ab</sup>	7.62 ± 0.01 <sup>aa</sup>
85 °C	–	4.56 ± 0.08 <sup>bc</sup>	7.45 ± 0.01 <sup>ac</sup>	7.51 ± 0.07 <sup>ab</sup>
90 °C	–	3.66 ± 0.07 <sup>bd</sup>	7.33 ± 0.04 <sup>bd</sup>	7.23 ± 0.09 <sup>bc</sup>
NaCl	Non-treated	7.68 ± 0.04 <sup>aa</sup>	7.60 ± 0.04 <sup>ba</sup>	7.49 ± 0.02 <sup>ca</sup>
10 g/L	1	7.39 ± 0.01 <sup>bb</sup>	7.64 ± 0.11 <sup>ba</sup>	7.47 ± 0.02 <sup>ba</sup>
	2	7.02 ± 0.01 <sup>cc</sup>	7.61 ± 0.04 <sup>ba</sup>	7.32 ± 0.07 <sup>bb</sup>
	3	6.35 ± 0.09 <sup>de</sup>	7.34 ± 0.06 <sup>bc</sup>	7.22 ± 0.11 <sup>abc</sup>
15 g/L	1	7.08 ± 0.04 <sup>cc</sup>	7.32 ± 0.08 <sup>bc</sup>	7.43 ± 0.02 <sup>ba</sup>
	2	6.80 ± 0.08 <sup>bd</sup>	7.25 ± 0.02 <sup>bc</sup>	7.28 ± 0.01 <sup>abc</sup>
	3	6.20 ± 0.06 <sup>de</sup>	7.10 ± 0.06 <sup>cd</sup>	7.14 ± 0.09 <sup>bc</sup>
20 g/L	1	6.99 ± 0.03 <sup>cd</sup>	7.36 ± 0.03 <sup>ab</sup>	7.39 ± 0.02 <sup>ba</sup>
	2	5.74 ± 0.07 <sup>de</sup>	7.25 ± 0.01 <sup>bc</sup>	7.18 ± 0.08 <sup>bc</sup>
	3	5.09 ± 0.06 <sup>de</sup>	7.22 ± 0.08 <sup>cd</sup>	7.16 ± 0.01 <sup>bc</sup>
pH	Non-treated	7.76 ± 0.03 <sup>aa</sup>	7.63 ± 0.01 <sup>ba</sup>	7.59 ± 0.09 <sup>ba</sup>
6.0	1	7.45 ± 0.09 <sup>ab</sup>	7.43 ± 0.11 <sup>ab</sup>	7.04 ± 0.04 <sup>bc</sup>
	2	7.22 ± 0.08 <sup>abc</sup>	7.35 ± 0.13 <sup>ab</sup>	7.12 ± 0.07 <sup>abc</sup>
	3	7.12 ± 0.02 <sup>bc</sup>	7.29 ± 0.11 <sup>ab</sup>	7.13 ± 0.02 <sup>abc</sup>
4.0	1	7.33 ± 0.02 <sup>ab</sup>	7.30 ± 0.08 <sup>bb</sup>	7.23 ± 0.09 <sup>bb</sup>
	2	6.29 ± 0.01 <sup>de</sup>	7.37 ± 0.01 <sup>ab</sup>	7.13 ± 0.13 <sup>bc</sup>
	3	6.13 ± 0.08 <sup>de</sup>	7.30 ± 0.11 <sup>ab</sup>	7.08 ± 0.08 <sup>bc</sup>
2.0	1	6.20 ± 0.07 <sup>de</sup>	6.59 ± 0.04 <sup>bc</sup>	7.08 ± 0.02 <sup>abc</sup>
	2	5.10 ± 0.10 <sup>de</sup>	6.23 ± 0.08 <sup>bd</sup>	6.71 ± 0.02 <sup>acd</sup>
	3	4.13 ± 0.08 <sup>de</sup>	6.16 ± 0.10 <sup>bd</sup>	6.47 ± 0.01 <sup>de</sup>

AM: Calcium alginate microparticles; ACSM: Calcium alginate microparticles coated of chitosan with concentration 5 g/L. a–h: different superscript letters in the same row denote differences ( $p < 0.05$ ) between the viable cell counts for the strain free cells or microencapsulated when exposed to the same stress condition, according to the Tukey's test. A–H: different capital letters in the same column denote differences ( $p < 0.05$ ) between the viable cell counts for the strain free cells or microencapsulated when exposed to the different stress condition, according to the Tukey's test.

the range of 1 to 3.6 log CFU/mL after exposure to different pH values (Table 3); the viability decreased as the pH values decreased and the time of exposure increased ( $p < 0.05$ ). For *L. acidophilus* La-05 in AM and ACSM, decreases ( $p < 0.05$ ) < 1 log CFU/mL were observed (Table 3). These data show that microencapsulation help probiotics to maintain the viability during exposure to acidic environments.

Free cells were able to survive in suitable counts (> 6 log CFU/mL) after exposure to pH 6 and 4 but presented lower counts (4.13–5.10 CFU/mL) at pH 2 for 2 or 3 h. In both tested microparticles, the probiotic maintained the suitable viability (> 6 log CFU/mL) at all pH and times indicating feasibility for incorporation in products with very high acidity. In a general view, differences ( $p < 0.05$ ) were observed in probiotic survival between AM and ACSM. At pH 6 and 4, the incorporation of chitosan to the alginate microparticles reduced the probiotic survival ( $p < 0.05$ ), meanwhile a protection ( $p < 0.05$ ) was

**Table 4**  
Physicochemical characteristics of vegan milks during 7 days of refrigerated storage (7 °C).

Parameter	Storage (days)	Rice Milk			Soybean Milk		
		AM	ACSM	Free cells	AM	ACSM	Free cells
pH	0	6.54 ± 0.01 <sup>bc</sup>	6.54 ± 0.01 <sup>bc</sup>	6.33 ± 0.02 <sup>ad</sup>	6.66 ± 0.01 <sup>bb</sup>	6.75 ± 0.01 <sup>ba</sup>	6.65 ± 0.01 <sup>bb</sup>
	7	6.75 ± 0.01 <sup>ab</sup>	6.76 ± 0.01 <sup>ab</sup>	6.31 ± 0.01 <sup>ad</sup>	6.69 ± 0.01 <sup>ac</sup>	6.82 ± 0.01 <sup>aa</sup>	6.70 ± 0.03 <sup>ac</sup>
TSS	0	8.20 ± 0.10 <sup>bd</sup>	10.50 ± 0.20 <sup>bc</sup>	1.50 ± 0.20 <sup>af</sup>	14.77 ± 0.06 <sup>ab</sup>	16.50 ± 0.90 <sup>aa</sup>	7.43 ± 0.06 <sup>ae</sup>
	7	11.17 ± 0.06 <sup>ac</sup>	12.03 ± 0.15 <sup>ab</sup>	1.93 ± 0.11 <sup>ae</sup>	14.83 ± 0.25 <sup>aa</sup>	14.33 ± 0.06 <sup>ba</sup>	6.93 ± 0.12 <sup>ad</sup>
L <sup>*</sup>	0	61.08 ± 0.18 <sup>bc</sup>	64.67 ± 0.11 <sup>ab</sup>	66.53 ± 0.07 <sup>aa</sup>	59.41 ± 0.17 <sup>af</sup>	61.43 ± 0.26 <sup>bd</sup>	62.54 ± 0.16 <sup>ac</sup>
	7	61.99 ± 0.39 <sup>ad</sup>	63.24 ± 0.17 <sup>bb</sup>	66.07 ± 0.06 <sup>ba</sup>	59.57 ± 0.14 <sup>ae</sup>	61.89 ± 0.10 <sup>ad</sup>	62.68 ± 0.19 <sup>ac</sup>
a <sup>*</sup>	0	-1.59 ± 0.03 <sup>ad</sup>	-1.18 ± 0.02 <sup>ac</sup>	-0.58 ± 0.01 <sup>ad</sup>	-1.49 ± 0.03 <sup>ab</sup>	-0.24 ± 0.02 <sup>ac</sup>	-0.62 ± 0.01 <sup>ad</sup>
	7	-1.22 ± 0.04 <sup>ba</sup>	-1.20 ± 0.03 <sup>ab</sup>	-0.59 ± 0.02 <sup>ac</sup>	-0.76 ± 0.03 <sup>bb</sup>	-0.10 ± 0.03 <sup>bc</sup>	-0.39 ± 0.02 <sup>bd</sup>
b <sup>*</sup>	0	2.60 ± 0.05 <sup>bc</sup>	6.07 ± 0.03 <sup>ba</sup>	2.79 ± 0.02 <sup>ac</sup>	8.32 ± 0.16 <sup>bc</sup>	11.91 ± 0.25 <sup>aa</sup>	8.69 ± 0.01 <sup>ab</sup>
	7	4.63 ± 0.09 <sup>ac</sup>	6.73 ± 0.03 <sup>ad</sup>	2.29 ± 0.07 <sup>bf</sup>	8.80 ± 0.05 <sup>ab</sup>	10.71 ± 0.16 <sup>ba</sup>	8.21 ± 0.14 <sup>bc</sup>

AM: Calcium alginate microparticles; ACSM: Calcium alginate microparticles coated of chitosan with concentration 5 g/L. a–g: different superscript letters in the same row denote differences ( $p < 0.05$ ) between the same time in the different samples during storage, according to the Tukey's test. A–C different capital letters in the same column denote differences ( $p < 0.05$ ) between the different times in the same sample during storage, according to the Tukey's test.

observed at pH 2. The results suggest that chitosan could act as protector in very low pH medium. In fact, the stability of the alginate–chitosan beads is at its maximum at pH 2, acting as a buffer against acids that penetrate into the bead, and raising the pH inside the matrix to a level which is less harmful for probiotics (Nualkaekul et al., 2012).

The results of the survival of *L. acidophilus* La-05 in freeze-dried microparticles during exposure to stresses suggest that microencapsulation was a suitable methodology to increase the probiotic resistance to heat treatment, NaCl, and low pH values, resulting in suitable probiotic counts ( $> 6 \log$  CFU/mL) even when high temperatures (90 °C) and NaCl concentration (20 g/L), or low pH values (pH = 2) were used. This is important when considering the application of freeze-dried probiotic culture in food products, as heat treatment, concentrations of 2% of NaCl, and low pH values are commonly found. In products with high acidity (pH = 2), it is advisable to use chitosan as a coating in the alginate microparticles.

### 3.4. Physicochemical characteristics and probiotic survival in vegan milks during refrigerated storage and *in vitro* digestion

Table 4 presents the physicochemical characteristics of the vegan milks during refrigerated storage. The rice milk presented pH of 6.31–6.76, TSS of 1.50–12.03 °Brix, and a white color ( $L^* = 61.08$ – $66.53$ ;  $a^* = -0.58$ – $-1.59$ ;  $b^* = 2.29$ – $6.73$ ), while the soybean milk presented pH of 6.65–6.82, TSS of 6.93–16.50 °Brix, and a yellow color ( $L^* = 59.41$ – $62.60$ ;  $a^* = -0.10$ – $-1.49$ ;  $b^* = 8.21$ – $11.91$ ). The soybean milk presented a higher pH value and TSS content than the rice milk ( $p < 0.05$ ). The higher pH value can be explained by the buffer capacity of the proteins in soybean milk (Silva, Silva, & Ribeiro, 2020). The higher TSS content is associated to the chemical composition of the vegan milks, as soybean milk is characterized by a higher concentration of fat, protein and ash than rice milk (Abou-Dobara, Ismail, & Refaat, 2016).

For both vegan milks, the incorporation of the microparticles (AM and ACSM) resulted in higher pH and TSS values, as well as, a darker coloration (lower  $L^*$  values,  $p < 0.05$ , day 1). Sodium alginate has a white to yellow color, which can contribute to color alterations in food products (Holkem et al., 2016). Furthermore, both components (alginate and chitosan) have basic nature and were incorporated at 30 g/L for alginate and 5 g/L for chitosan, which resulted in increases in the pH and TSS values. The incorporation of chitosan to the alginate microparticles (ACSM) resulted in products with the highest TSS values, and more pronounced yellow color (higher  $b^*$  values,  $p < 0.05$ ). The results suggest that the incorporation of the probiotic microparticles to vegan milks has impact on the physicochemical characteristics of the products, regardless of the raw material used (rice or soybean milk). The higher pH and TSS values observed in the vegan milks with probiotic microparticles could be positive from the consumer point of view, as it is expected products with low acidity and slightly sweet. Furthermore, the higher pH can result in a higher probiotic survival, as decreased probiotic viability are observed in products with low pH values (Costa et al., 2019).

During storage, the vegan milks incorporated with probiotic microparticles behaved differently from those with free cells ( $p < 0.05$ ). For the rice milks, the alterations observed for the products at the 1st day of storage were intensified, i.e., there was an increase in the pH and TSS values and an increase in the yellow color (higher  $b^*$  values) during storage of the vegan milks incorporated with probiotic microparticles (AM and ACSM) ( $p < 0.05$ ). For soy milks, in a general view, the addition of the alginate microparticles (AM) maintained the characteristics during storage (pH, TSS,  $L^*$  and  $a^*$ ) similar to the product with free cells ( $p > 0.05$ ). The incorporation of chitosan to the alginate microparticles (ACSM) resulted in products with lower TSS values, and lighter color (lower  $L^*$  and  $b^*$  values,  $p < 0.05$ ). The decrease in the TSS values for the ACSM in soybean milks probably is related to the consumption of sugars by the probiotic cultures, suggesting that the

**Table 5**  
Counts (log CFU/mL) for microencapsulated *L. acidophilus* La-05 freeze-dried in vegan milks during 7 days of refrigerated storage (7 °C).

Time (days)	Viable cell counts (log CFU/mL)					
	Rice Milk			Soybean Milk		
	AM	ACSM	Free cells	AM	ACSM	Free cells
0	7.48 ± 0.08 <sup>ab</sup>	7.82 ± 0.07 <sup>ba</sup>	7.53 ± 0.04 <sup>ab</sup>	7.33 ± 0.06 <sup>ac</sup>	7.80 ± 0.01 <sup>aa</sup>	7.51 ± 0.04 <sup>ab</sup>
3	7.34 ± 0.06 <sup>ba</sup>	7.33 ± 0.06 <sup>ba</sup>	6.66 ± 0.03 <sup>bc</sup>	7.28 ± 0.03 <sup>ab</sup>	7.61 ± 0.02 <sup>ba</sup>	6.52 ± 0.09 <sup>bd</sup>
7	7.10 ± 0.03 <sup>bc</sup>	7.19 ± 0.07 <sup>cb</sup>	6.62 ± 0.08 <sup>bd</sup>	7.12 ± 0.02 <sup>bbc</sup>	7.56 ± 0.09 <sup>ba</sup>	6.50 ± 0.02 <sup>bc</sup>

AM: Calcium alginate microparticles; ACSM: Calcium alginate microparticles coated of chitosan with concentration 5 g/L. a–g: different superscript letters in the same row denote differences ( $p < 0.05$ ) between the same time in the different samples during storage, according to the Tukey's test. A–C different capital letters in the same column denote differences ( $p < 0.05$ ) between the different times in the same sample during storage, according to the Tukey's test.

probiotic survival was improved in this matrix.

Table 5 presents the viability of the freeze-dried *L. acidophilus* La-05 during refrigerated storage when incorporated in vegan milks. Freeze-dried *L. acidophilus* La-05 free cells decreased ( $p < 0.05$ ) in the range of 1 log CFU/mL during storage in vegan milks. For *L. acidophilus* La-05 in AM and ACSM, decreases ( $p < 0.05$ ) of 0.38–0.63 and 0.21–0.24 log CFU/mL were observed for rice and soybean milks, respectively (Table 5). Furthermore, differences ( $p < 0.05$ ) were observed in probiotic survival between AM and ACSM, with a protection provided by the chitosan coating. Therefore, the microencapsulation and the chitosan coating improved the survival of the probiotic cultures during storage of vegan milks. In animal milks, the microencapsulation was efficient in protecting the probiotic strains during storage (Prasana & Charalampopoulos, 2018). The protection provided by microparticles could be associated to the higher pH values of the products (Table 4), as well as, by the physical protection. Chitosan was able to cover the porous beads of alginate (Fig. 2), which increased the protection of the probiotic culture. To the best of our knowledge, this is the first study assessing the survival of *L. acidophilus* La-05 in AM or ACSM during storage in vegan milks. All formulations presented suitable probiotic counts ( $> 6$  log CFU/mL) during refrigerated storage (7 °C for 7 days), which is the commonly shelf life of pasteurized cow milk, suggesting that the rice and soybean milks are important carriers for the incorporation of probiotic cultures.

Table 6 presents the viability of the freeze-dried *L. acidophilus* La-05 during simulated gastrointestinal digestion when incorporated in vegan milks. During the simulated digestion in distilled water, the *L. acidophilus* La-05 free cells decreased ~ 3 log CFU/mL after the esophagus-stomach and duodenum phases. At the end of the *in vitro* digestion (ileum), counts of *L. acidophilus* La-05 free cells were below the limit of detection. The vegan milks matrices provided a protection to the probiotic cells, as at the end of the *in vitro* digestion it was observed counts of 4.20 log CFU/mL in rice milk and 4.38 log CFU/mL in soybean milk. These results are associated to the chemical composition and nutrients that were present in the vegan milks but not in the distilled water and could be used by the probiotic cultures. Furthermore, vegan milks can contain substances with prebiotic potential that can protect the cells from the adverse conditions of digestion (Kandyliis, Pissaridi, Bekatorou, Kanellaki, & Kouřinas, 2016).

The microencapsulation of the *L. acidophilus* La-05 (ACSM and AM) resulted in increased survival during the *in vitro* digestion ( $p < 0.05$ ). The *L. acidophilus* La-05 counts decreased ~ 1 log CFU/mL after the esophagus-stomach and duodenum phases (Table 6). At the end of the *in vitro* digestion (ileum), counts were higher than 6 log CFU/mL, regardless of the matrix (distilled water, rice milk or soybean milk). The ability to tolerate digestive stresses is one of the main requirements to the successful incorporation of probiotics in food. Before colonizing the intestinal tract, microorganisms should survive to pH changes and the action of digestive enzymes that occur in the stomach and intestine (Hill et al., 2014). Results show that microencapsulation in AM or ACSM may improve the cell viability of probiotics incorporated in vegan milks when exposed to gastrointestinal tract, as only the products with microencapsulated probiotic cultures presented suitable counts ( $> 6$  log cfu/mL) after simulated gastrointestinal conditions. The incorporation of chitosan in the alginate coating (ACSM) did not improve the survival of the probiotic culture to the *in vitro* digestion ( $p > 0.05$ ). The protective effect of chitosan was probably suppressed due to the drastic conditions of the simulated gastrointestinal system.

4. Conclusion

Microencapsulation using alginate coating by external ionic gelation technique proved to be a suitable technology, resulting in microparticles spherical and uniform without agglomeration. Microencapsulated probiotic cultures could survive at suitable counts ( $> 6$  log CFU/mL) to refrigerated storage (7 °C for 120 days), and

Table 6  
Conditions used during the simulated digestion and the resultant viable cell counts of freeze-dried microencapsulated *L. acidophilus* La-05 in vegan milks.

Organ	Condition	String (rpm)	pH	Time (min)	Viable cell counts (log CFU/mL)										
					Distilled water		Rice Milk		Soybean Milk						
					AM	ACSM	Free cells	AM	ACSM	Free cells	AM	ACSM	Free cells		
Before simulation	-	-	-	-	7.70 ± 0.09 <sup>abA</sup>	7.66 ± 0.04 <sup>abA</sup>	7.58 ± 0.09 <sup>abA</sup>	7.63 ± 0.10 <sup>abA</sup>	7.61 ± 0.03 <sup>ba</sup>	7.61 ± 0.03 <sup>ba</sup>	7.79 ± 0.02 <sup>ba</sup>	7.75 ± 0.05 <sup>baA</sup>	7.54 ± 0.06 <sup>ba</sup>		
Esophagus-Stomach	Pepsin	130	5.5	10	7.28 ± 0.01 <sup>baB</sup>	7.20 ± 0.16 <sup>baB</sup>	7.17 ± 0.17 <sup>baB</sup>	7.41 ± 0.01 <sup>baB</sup>	7.33 ± 0.17 <sup>baB</sup>	7.33 ± 0.17 <sup>baB</sup>	7.14 ± 0.08 <sup>baB</sup>	7.64 ± 0.03 <sup>baB</sup>	7.51 ± 0.02 <sup>baB</sup>	7.26 ± 0.13 <sup>baB</sup>	
			4.5	10	7.12 ± 0.01 <sup>bc</sup>	6.99 ± 0.05 <sup>bc</sup>	6.39 ± 0.21 <sup>bc</sup>	7.37 ± 0.04 <sup>bc</sup>	7.13 ± 0.05 <sup>bc</sup>	6.70 ± 0.11 <sup>bc</sup>	7.58 ± 0.02 <sup>bc</sup>	7.54 ± 0.06 <sup>baB</sup>	7.40 ± 0.04 <sup>baB</sup>	7.40 ± 0.04 <sup>baB</sup>	
			3.8	10	7.07 ± 0.10 <sup>bc</sup>	6.70 ± 0.05 <sup>bc</sup>	5.76 ± 0.04 <sup>bc</sup>	7.12 ± 0.01 <sup>bc</sup>	6.64 ± 0.15 <sup>bc</sup>	6.13 ± 0.04 <sup>bc</sup>	7.37 ± 0.07 <sup>bc</sup>	7.31 ± 0.01 <sup>bc</sup>	7.18 ± 0.06 <sup>bc</sup>	7.31 ± 0.01 <sup>bc</sup>	6.12 ± 0.09 <sup>bc</sup>
			2.8	20	6.95 ± 0.02 <sup>cd</sup>	6.65 ± 0.02 <sup>cd</sup>	5.24 ± 0.05 <sup>cd</sup>	7.06 ± 0.02 <sup>cd</sup>	6.60 ± 0.05 <sup>cd</sup>	5.72 ± 0.01 <sup>cd</sup>	6.60 ± 0.05 <sup>cd</sup>	6.70 ± 0.03 <sup>cd</sup>	7.18 ± 0.06 <sup>bc</sup>	6.70 ± 0.03 <sup>cd</sup>	5.61 ± 0.07 <sup>cd</sup>
			2.3	20	6.66 ± 0.06 <sup>de</sup>	6.48 ± 0.07 <sup>de</sup>	5.02 ± 0.03 <sup>de</sup>	6.77 ± 0.05 <sup>cd</sup>	6.40 ± 0.02 <sup>de</sup>	6.77 ± 0.05 <sup>cd</sup>	6.40 ± 0.02 <sup>de</sup>	6.67 ± 0.01 <sup>de</sup>	6.94 ± 0.04 <sup>de</sup>	6.67 ± 0.01 <sup>de</sup>	5.58 ± 0.08 <sup>cd</sup>
			2.0	20	6.50 ± 0.03 <sup>de</sup>	6.30 ± 0.11 <sup>de</sup>	4.37 ± 0.02 <sup>de</sup>	6.45 ± 0.06 <sup>de</sup>	6.41 ± 0.02 <sup>de</sup>	6.45 ± 0.06 <sup>de</sup>	6.41 ± 0.02 <sup>de</sup>	6.52 ± 0.02 <sup>de</sup>	6.81 ± 0.08 <sup>de</sup>	6.52 ± 0.02 <sup>de</sup>	5.03 ± 0.02 <sup>de</sup>
Duodenum	Pancreatin + bile salt	45	5.0	30	6.37 ± 0.02 <sup>de</sup>	6.27 ± 0.13 <sup>de</sup>	4.02 ± 0.01 <sup>de</sup>	6.45 ± 0.02 <sup>de</sup>	6.31 ± 0.07 <sup>de</sup>	4.36 ± 0.04 <sup>de</sup>	6.73 ± 0.02 <sup>de</sup>	6.41 ± 0.09 <sup>de</sup>	4.63 ± 0.03 <sup>de</sup>		
			6.5	60	6.20 ± 0.04 <sup>de</sup>	6.22 ± 0.02 <sup>de</sup>	nd	6.32 ± 0.08 <sup>de</sup>	6.23 ± 0.09 <sup>de</sup>	4.20 ± 0.10 <sup>de</sup>	6.56 ± 0.02 <sup>de</sup>	6.32 ± 0.08 <sup>de</sup>	4.38 ± 0.15 <sup>de</sup>		

Steps 1 to 6: stages to simulate the conditions in the esophagus - stomach; step 7: stage to simulate the conditions in the duodenum; step 8: stage to simulate the conditions in the ileum. AM: Calcium alginate microparticles; ACSM: Calcium alginate microparticles coated of chitosan with concentration 5 g/L; nd: not detected. a-h: different superscript letters in the same row denote differences ( $p < 0.05$ ) between the viable cell counts for the strain free cells or microencapsulated when assayed in distilled water or vegan milks exposed to the same step of the simulated digestion, according to the Tukey's test. A-H: different capital letters in the same column denote differences ( $p < 0.05$ ) between the viable cell counts for the strain free cells or microencapsulated when assayed in distilled water or vegan milks and exposed to the different step of the simulated digestion, according to the Tukey's test.

exposure to thermal (up to 90 °C for 30 s), osmotic (up to 20 g/L) and acid (up to pH 2) stresses, as well as during refrigerated storage (7 °C for 7 days) and simulated gastrointestinal conditions when incorporated in vegan milks (rice and soybean), which was not observed for free cells. The utilization of chitosan coating in the alginate microparticle is recommended only for increasing the survival of the probiotic cultures in vegan milks. The results of the present study are important for the food industry as they indicate rice and soybean milks as adequate matrices for incorporation of microencapsulated *L. acidophilus* La-05.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support (code 001), Fundação de Apoio a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for the scholarship granted to the lead author (Lopes, L. A. A.), Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), and COMCAP/UEM for the availability of infrastructure.

#### References

- Abdel-Latif, E. F., & Saad, M. F. (2016). Effect of *Bifidobacterium lactis* on quality of rice pudding as a probiotic food carrier. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5, 362–371.
- Abou-Dobara, M. I., Ismail, M. M., & Refaat, N. M. (2016). Chemical composition, sensory evaluation and starter activity in cow, soy, peanut and rice milk. *Journal of Nutritional Health & Food Engineering*, 5, 1–8.
- Aboulfazi, F., Baba, A. S., & Miran, M. (2015). The rheology and physical properties of fermented probiotic ice creams made with dairy alternatives. *International Journal of Food Engineering*, 11, 493–504.
- Alves, M., Peres, C. M., Hernandez-Mendoza, A., Bronze, M. R., Peres, C., & Malcata, F. X. (2015). Olive paste as vehicle for delivery of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* 33. *Food Research International*, 75, 61–70.
- Ansari, F., Pourjafar, H., Jodati, V., Sahebi, J., & Ataei, A. (2017). Effect of Eudragit S100 nanoparticles and alginate chitosan encapsulation on the viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus*. *AMB Express*, 7, 144.
- AOAC (2016). *Official Methods of Analysis*. 20th ed. AOAC Int'l., Gaithersburg, MD. 20th ed. AOAC Int'l., Gaithersburg, MD.
- Ashwar, B. A., Gani, A., Gani, A., Shah, A., & Masoodi, F. A. (2018). Production of RS4 from rice starch and its utilization as an encapsulating agent for targeted delivery of probiotics. *Food Chemistry*, 239, 287–294.
- Cai, S., Zhao, M., Fang, Y., Nishinari, K., Phillips, G. O., & Jiang, F. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* GIMCC1. 2686 via emulsification/internal gelation of alginate using Ca-EDTA and CaCO<sub>3</sub> as calcium sources. *Food Hydrocolloids*, 39, 295–300.
- Castro-Cislaghi, F. P., Carina Dos Reis, E. S., Fritzen-Freire, C. B., Lorenz, J. G., & Sant'Anna, E. S. (2012). *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. *Journal of Food Engineering*, 113, 186–193.
- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., & del Carmen Villarín, M. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 142, 185–189.
- Costa, K. K. F. D., Júnior, M. S. S., Rosa, S. I. R., Caliani, M., & Pimentel, T. C. (2017). Changes of probiotic fermented drink obtained from soy and rice byproducts during cold storage. *LWT*, 78, 29–30.
- Costa, G. M., Paula, M. M., Barão, C. E., Klososki, S. J., Bonafé, E. G., Visentainer, J. V., ... Pimentel, T. C. (2019). Yoghurt added with *Lactobacillus casei* and sweetened with natural sweeteners and/or prebiotics: Implications on quality parameters and probiotic survival. *International Dairy Journal*, 97, 139–148.
- Darjani, P., Nezhad, M. H., Kakhodaei, R., & Milani, E. (2016). Influence of prebiotic and coating materials on morphology and survival of a probiotic strain of *Lactobacillus casei* exposed to simulated gastrointestinal conditions. *LWT*, 73, 162–167.
- De Prisco, A., Maresca, D., Ongeng, D., & Mauriello, G. (2015). Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. *Food Science and Technology*, 61, 452–462.
- Espirito-Santo, A. P., Mouquet-Rivier, C., Humblot, C., Cazevielle, C., Icard-Vernière, C., Soccol, C. R., & Guyot, J. P. (2014). Influence of cofermentation by amylolytic *Lactobacillus* strains and probiotic bacteria on the fermentation process, viscosity and microstructure of gels made of rice, soy milk and passion fruit fiber. *Food Research International*, 57, 104–113.
- Etchepare, M. A., Raddatz, G. C., de Moraes Flores, E. M., Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., Barin, J. S., ... de Menezes, C. R. (2016). Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 511–517.
- Guedes, J. S., Pimentel, T. C., Diniz-Silva, H. T., da Cruz Almeida, E. T., Tavares, J. F., de Souza, E. L., ... Magnani, M. (2019). Protective effects of β-glucan extracted from spent brewer yeast during freeze-drying, storage and exposure to simulated gastrointestinal conditions of probiotic lactobacilli. *LWT*, 116, 108496.
- He, L. D., Guo, X. N., & Zhu, K. X. (2019). Effect of soybean milk addition on the quality of frozen-cooked noodles. *Food Hydrocolloids*, 87(187–193), 4.
- Hergstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 44, 121–129.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... Calder, P. C. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514.
- Holkem, A. T., Raddatz, G. C., Nunes, G. L., Cichoski, A. J., Jacob-Lopes, E., Grosso, C. R. F., & de Menezes, C. R. (2016). Development and characterization of alginate microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 produced by emulsification/internal gelation followed by freeze drying. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 302–308.
- Jiang, T., Singh, B., Maharjan, S., Li, H. S., Kang, S. K., Bok, J. D., ... Choi, Y. J. (2014). Oral delivery of probiotic expressing M cell homing peptide conjugated Bmpb vaccine encapsulated into alginate/chitosan/alginate microcapsules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 88, 768–777.
- Kandyli, P., Pissaridi, K., Bekatorou, A., Kanellaki, M., & Koutinas, A. A. (2016). Dairy and non-dairy probiotic beverages. *Current Opinion in Food Science*, 7, 58–63.
- Kerry, R. G., Patra, J. K., Gonda, S., Park, Y., Shin, H. S., & Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26, 927–939.
- Liu, L., Chen, P., Zhao, W., Li, X., Wang, H., & Qu, X. (2017). Effect of microencapsulation with the maillard reaction products of whey proteins and isomaltuligosaccharide on the survival rate of *Lactobacillus rhamnosus* in white brined cheese. *Food Control*, 79, 44–49.
- Madureira, A. R., Amorim, M., Gomes, A. M., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2011). Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 44, 465–470.
- Min, M., Bunt, C. R., Mason, S. L., & Hussain, M. A. (2019). Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59, 2626–2641.
- Nualkaekul, S., Lenton, D., Cook, M. T., Khutoryanskiy, V. V., & Charalampopoulos, D. (2012). Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. *Carbohydrate Polymers*, 90, 1281–1287.
- Poletti, G., Fonseca, B. D. S., Raddatz, G. C., Wagner, R., Lopes, E. J., Barin, J. S., ... Menezes, C. R. D. (2019). Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and different prebiotic agents by external ionic gelation followed by freeze-drying. *Ciência Rural*, 49, 1–7.
- Prasanna, P. H. P., & Charalampopoulos, D. (2018). Encapsulation of *Bifidobacterium longum* in alginate-dairy matrices and survival in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, cow milk and goat milk. *Food Bioscience*, 21, 72–79.
- Rather, S. A., Akhter, R., Masoodi, F. A., Gani, A., & Wani, S. M. (2017). Effect of double alginate microencapsulation on in vitro digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297. *LWT - Food Science and Technology*, 83, 50–58.
- Sabikhi, L., Babu, R., Thompson, D. K., & Kapila, S. (2010). Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 586–593.
- Shi, J., Alves, N. M., & Mano, J. F. (2008). Chitosan coated alginate beads containing poly (N-isopropylacrylamide) for dual-stimuli-responsive drug release. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 84, 595–603.
- Silva, K. C. G., Cezarino, E. C., Michelon, M., & Sato, A. C. K. (2018). Symbiotic microencapsulation to enhance *Lactobacillus acidophilus* survival. *LWT*, 89, 503–509.
- Silva, A. R., Silva, M. M., & Ribeiro, B. D. (2020). Health Issues and Technological Aspects of Plant-based Alternative Milk. *Food Research International*, 108972. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108972>.
- Vaziri, A. S., Alemzadeh, I., & Vossoughi, M. (2018). Improving survivability of *Lactobacillus plantarum* in alginate-chitosan beads reinforced by Na-tripolyphosphate dual cross-linking. *LWT*, 97, 440–447.
- Verruck, S., Dantas, A., & Prudencio, E. S. (2019). Functionality of the components from goat's milk, recent advances for functional dairy products development and its implications on human health. *Journal of Functional Foods*, 52, 243–257.
- Zanjani, M. A. K., Tarzi, B. G., Sharifan, A., Mohammadi, N., Bakhoda, H., & Madanipour, M. M. (2012). Microencapsulation of *Lactobacillus casei* with calcium alginate-resistant starch and evaluation of survival and sensory properties in cream-filled cake. *African Journal of Microbiology Research*, 6, 5511–5517.
- Zanjani, M. A. K., Tarzi, B. G., Sharifan, A., & Mohammadi, N. (2014). Microencapsulation of probiotics by calcium alginate-gelatinized starch with chitosan coating and evaluation of survival in simulated human gastro-intestinal condition. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 13, 843.

## ANEXO A - COMPROVANTE DE ACEITE DO ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO FOOD RESEARCH INTERNATIONAL (ISSN 0963-9969)

31/07/2020

Gmail - Fwd: Your Submission



Laênia Lopes &lt;laenialopes@gmail.com&gt;

### Fwd: Your Submission

1 mensagem

**Marciane Magnani** <magnani2@gmail.com>  
 Para: Laênia Lopes <laenialopes@gmail.com>

4 de maio de 2020 10:56

----- Forwarded message -----

De: **Anderson Sant'Ana** <eesserver@eesmail.elsevier.com>  
 Date: Seg, 4 de mai de 2020 10:14  
 Subject: Your Submission  
 To: <magnani2@pq.cnpq.br>, <magnani2@gmail.com>  
 Cc: <bicas@unicamp.br>

Ms. Ref. No.: FOODRES-D-20-01245R1

Title: Microencapsulation of Lactobacillus acidophilus La-05 and incorporation in vegan milks: Physicochemical characteristics and survival during storage, exposure to stress conditions, and simulated gastrointestinal digestion  
 Food Research International

Dear Professor Marciane Magnani,

I am pleased to confirm that your paper "Microencapsulation of Lactobacillus acidophilus La-05 and incorporation in vegan milks: Physicochemical characteristics and survival during storage, exposure to stress conditions, and simulated gastrointestinal digestion" has been accepted for publication in Food Research International.

Your accepted manuscript will now be transferred to our production department and work will begin on creation of the proof. If we need any additional information to create the proof, we will let you know. If not, you will be contacted again in the next few days with a request to approve the proof and to complete a number of online forms that are required for publication.

Comments from the Editor and Reviewers can be found below.

Thank you for submitting your work to this journal.

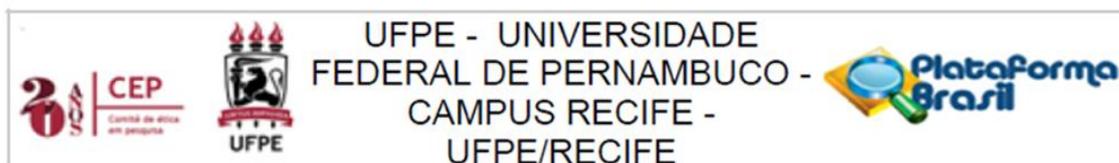
With kind regards,

Food Research International

Anderson de Souza Sant'Ana, Ph.D.  
 Editor-in-Chief

Comments from the Editors and Reviewers:

## ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** DESENVOLVIMENTO DE PASTA DE RICOTA CAPRINA COM PROBIÓTICOS MICROENCAPSULADOS

**Pesquisador:** LAENIA ANGÉLICA ANDRADE LOPES

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 19328619.7.0000.5208

**Instituição Proponente:** CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.617.817

#### Apresentação do Projeto:

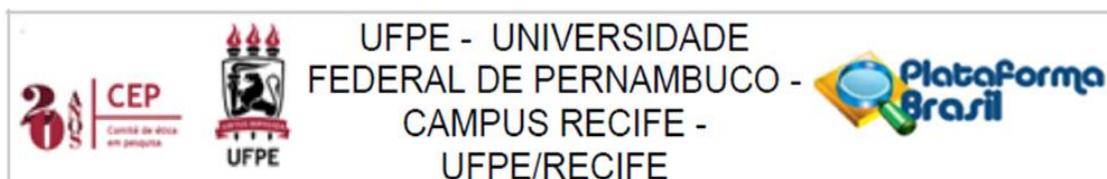
Trata-se da tese de doutorado da aluna LAÊNIA ANGÉLICA ANDRADE LOPES, do Programa de Pós-graduação em Nutrição da UFPE, sob orientação da profa. Dra. Thayza C. M. Stamford, cujo interesse é desenvolver uma pasta de ricota a partir de leite de cabra, considerado um veículo propício para o transporte e sobrevivência dos probióticos em decorrência dos seus níveis baixos de sal, pH maior que 6,0 e umidade elevada. Com probióticos encapsulados por micropartículas de alginato de cálcio e quitosana pode-se preservar a viabilidade celular na matriz alimentar.

#### Objetivo da Pesquisa:

**PRIMÁRIO:** Desenvolver uma pasta de ricota caprina com *L. acidophilus* La-05 microencapsulado que seja caracterizado quanto as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do produto.

**SECUNDÁRIO:** Produzir micropartículas de alginato de cálcio com e sem o revestimento de quitosana contendo *L. acidophilus* La-05; • Liofilizar *L. acidophilus* La-05 livres e em micropartículas de alginato com e sem o revestimento de quitosana; • Produzir quatro tipos de pasta de ricota caprina: pasta de ricota adicionado de micropartículas de alginato contendo *L. acidophilus* La-05, pasta de ricota adicionado de micropartículas de alginato revestido de quitosana contendo *L. acidophilus* La-05, pasta de ricota adicionado de células livres liofilizadas de *L. acidophilus* La-05 e pasta de ricota sem adição de micro-organismo; • Caracterizar físico-

**Endereço:** Av. da Engenharia s/n° - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.617.817

quimicamente e microbiologicamente a pasta de ricota caprina contendo *L. acidophilus* La-05 livres e em micropartículas de alginato com e sem o revestimento de quitosana; • Avaliar sensorialmente a pasta de ricota de cabra contendo *L. acidophilus* La-05 livres e em micropartículas de alginato com e sem o revestimento de quitosana.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

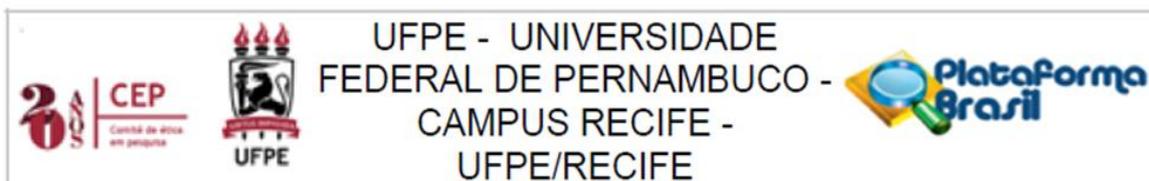
**RISCOS** – Desconforto sensorial ao degustar o produto pela falta de hábito de consumir queijo caprino. Indivíduos que sejam intolerantes à lactose ou alérgicos a proteína do leite não poderão participar da pesquisa. Procedimentos seguros para manipulação e armazenamento dos mesmos, seguindo Manual de Boas Práticas para serviços de Alimentação minimizarão os riscos inerentes à contaminação da pasta de ricota.

**BENEFÍCIOS:** Dentre os benefícios diretos aos participantes, ter-se-á a contribuição para melhor aporte de proteínas, compostos bioativos e bactéria probiótica que pode oferecer benefícios ao organismo.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

1.1 Produção das micropartículas: A cultura de *L. acidophilus* La-05 foi obtida na forma liofilizada da Chr. Hansen A/S (Denmark). A microencapsulação de *L. acidophilus* La-05 em alginato será realizada pela técnica de geificação iônica externa através de um encapsulador. 1.2 Fabricação da pasta de ricota caprina: Serão formulados quatro tipos de pasta de ricota caprina: pasta de ricota adicionado de micropartículas de alginato contendo *L. acidophilus* La-05, pasta de ricota adicionado de micropartículas de alginato revestido de quitosana contendo *L. acidophilus* La-05, pasta de ricota adicionado de células livres liofilizadas de *L. acidophilus* La-05 e pasta de ricota sem adição de micro-organismo. As amostras de pasta de ricota caprina irão ser avaliadas nos dias 1º, 7º e 14º de sua fabricação em duas repetições, e em triplicatas. 1.3 Análises físico-química: As amostras de pasta de ricota caprina serão submetidas aos ensaios para determinação de: pH, acidez, umidade, proteínas, cinzas, lipídeos e açúcar redutor em lactose, cujas análises serão realizadas segundo metodologias da Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (2005). 1.4 Avaliação microbiológica: as amostras de pasta de ricota caprina serão submetidos às análises microbiológicas preconizadas pela legislação vigente RDC Nº 12, de 2 de Janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) destinadas aos queijos de alta umidade que fazem parte do grupo de alimentos nº 8 (leite de bovinos e de outros mamíferos e derivados). Serão realizadas análises de *Listeria monocytogenes*, Coliformes a 45°C, *Staphylococcus coagulase positiva* e *Salmonella* sp, segundo metodologias da American Public Health Association (APHA) (2001). 1.5 Análise Sensorial: somente

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.617.817

serão submetidos a este teste os queijos cujas análises microbiológicas indicaram o atendimento aos padrões recomendados pela legislação específica (BRASIL, 1996). A avaliação sensorial dos queijos irá ser realizada através de teste de aceitação do consumidor e preferência entre as amostras (VILLANUEVA; SILVA, 2009). O teste de aceitação do consumidor será baseado na aparência, cor, textura, sabor, aroma e impressão global do produto, utilizando-se escala hedônica estruturada de 9 pontos (1=desgostei muitíssimo; 5=nem gostei/nem desgostei; 9=gostei muitíssimo). Os queijos serão considerados aceitos quando obtiverem média 5,0 ("gostei moderadamente"). Para o teste de preferência os provadores serão convidados a escolher as amostras mais e menos apreciadas. A intenção de compra também será avaliada através de escala hedônica de 5 pontos (1 = jamais compraria; 2 = possivelmente não compraria; 3 = talvez comprasse/talvez não comprasse; 4= possivelmente compraria; 5 = compraria). Os testes serão realizados por uma equipe de 100 provadores não treinados, consumidores habituais do produto, recrutados aleatoriamente uma única vez. Os participantes assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. As amostras serão apresentadas individualmente, em recipientes descartáveis, devidamente codificados com números aleatórios de 3 dígitos a uma temperatura de 7 a 10 °C e avaliadas em cabines individuais, sob luz branca, acompanhados com água mineral e bolacha tipo água e sal para remoção do sabor residual.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos obrigatórios foram apresentados e estão adequados.

**Recomendações:**

Sem recomendações

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

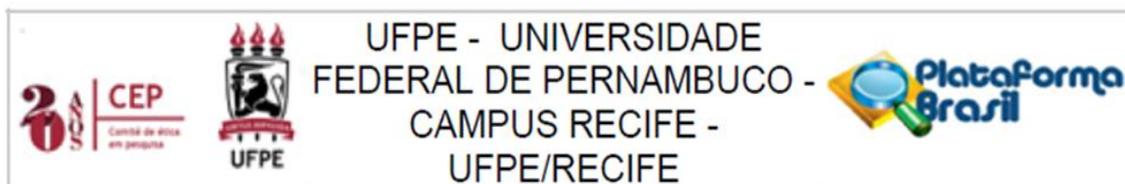
Sem pendências

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.617.817

participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

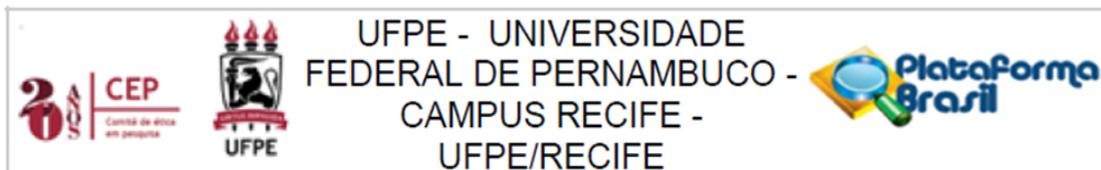
Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética, relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1399942.pdf	20/08/2019 08:29:16		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Tese_Detalhado.doc	20/08/2019 00:18:56	LAENIA ANGÉLICA ANDRADE LOPES	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_2.pdf	20/08/2019 00:09:44	LAENIA ANGÉLICA ANDRADE LOPES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEMaiores18.doc	20/08/2019 00:00:43	LAENIA ANGÉLICA ANDRADE LOPES	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_1.pdf	19/08/2019 23:59:03	LAENIA ANGÉLICA ANDRADE LOPES	Aceito
Outros	Declaracao_de_matricula.pdf	19/08/2019 23:58:03	LAENIA ANGÉLICA ANDRADE LOPES	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	16/08/2019 09:16:48	LAENIA ANGÉLICA ANDRADE LOPES	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_3.pdf	15/08/2019 23:04:18	LAENIA ANGÉLICA ANDRADE LOPES	Aceito
Outros	Termo_de_Confidencialidade.pdf	15/08/2019 11:41:05	LAENIA ANGÉLICA ANDRADE LOPES	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Laenia_Lopes.pdf	15/08/2019	LAENIA ANGÉLICA	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.617.817

Outros	Curriculo_Lattes_Laenia_Lopes.pdf	11:09:29	ANDRADE LOPES	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Thayza_Stamford.pdf	15/08/2019 11:07:10	LAENIA ANGÉLICA ANDRADE LOPES	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Marciane_Magnani.pdf	15/08/2019 11:04:24	LAENIA ANGÉLICA ANDRADE LOPES	Aceito
Outros	TESTE_DE_ORDENACAO_PREFEREN CIA.docx	26/07/2019 11:12:57	LAENIA ANGÉLICA ANDRADE LOPES	Aceito
Outros	TESTE_DE_ACEITACAO_E_INTENCA O DE COMPRA.docx	26/07/2019 11:11:43	LAENIA ANGÉLICA ANDRADE LOPES	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 03 de Outubro de 2019

---

**Assinado por:**  
**LUCIANO TAVARES MONTENEGRO**  
(Coordenador(a))

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600  
UF: PE Município: RECIFE  
Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br