

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
NOS TRÓPICOS**

***Lactobacillus plantarum* E *Lactobacillus rhamnosus*
LIVRES E ENCAPSULADOS INCORPORADOS EM
HAMBÚRGUER DE CARNE BOVINA:
UM ESTUDO DOS IMPACTOS E DA VIABILIDADE**

ADRIELLE BAHIENSE TREVISAN

Salvador – BA

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
NOS TRÓPICOS

Lactobacillus plantarum* E *Lactobacillus rhamnosus
LIVRES E ENCAPSULADOS INCORPORADOS EM
HAMBÚRGUER DE CARNE BOVINA:
UM ESTUDO DOS IMPACTOS E DA VIABILIDADE

ADRIELLE BAHIENSE TREVISAN
Médica Veterinária

Salvador – BA
2020

ADRIELLE BAHIANSE TREVISAN

***Lactobacillus plantarum* E *Lactobacillus rhamnosus*
LIVRES E ENCAPSULADOS INCORPORADOS EM
HAMBÚRGUER DE CARNE BOVINA:
UM ESTUDO DOS IMPACTOS E DA VIABILIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de **Doutora** em Ciência Animal nos Trópicos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Franke

Coorientador: Dr. Carlos Pasqualin Cavalheiro

SALVADOR – BA

2020

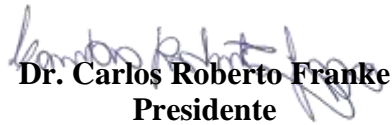
**Lactobacillus plantarum E Lactobacillus rhamnosus
LIVRES E ENCAPSULADOS INCORPORADOS EM
HAMBÚRGUER DE CARNE BOVINA:
UM ESTUDO DOS IMPACTOS E DA VIABILIDADE**

ADRIELLE BAHIANSE TREVISAN

**Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal
nos Trópicos**

Salvador, 04 de dezembro de 2020

Comissão examinadora:



Dr. Carlos Roberto Franke
Presidente
(UFBA)

Dra. Manuela da Silva Solcà
(UFBA)

Dra. Mariana Nougalli Roselino
(UFBA)

Dr. Maurício Costa Alves da Silva
(UFBA)

Dra. Mariana de Araújo Etchepare
(UP)


Luís Fernando Pita Gondim
Coordenador do Programa
EMEVZ / UFBA

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ADRIELLE BAHIANSE TREVISAN – Nascida em 07 de julho de 1986, na cidade de Salvador-BA. Possui Graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal da Bahia (2012); exerceu cargo de Médica Veterinária na Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (2013-2016); possui mestrado em Ciência de Alimentos pela Faculdade de Farmácia - Universidade Federal da Bahia (2016); atuou como professora substituta das disciplinas Inspeção e Tecnologia de Leites e Derivados (MEV157) e Tecnologia de Produtos de Origem Animal (MEVB79) (2016) na Universidade Federal da Bahia. Atualmente é doutoranda do Programa Ciência Animal nos Trópicos pela UFBA.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é inteiramente dedicado ao meu filho, Bernardo Trevisan Maggitti, fonte de toda a minha força.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, sempre, e antes de tudo;

À minha família pelo suporte;

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Carlos Roberto Franke, e meu Coorientador, Prof. Dr. Carlos Pasqualin Cavalheiro, pela confiança depositada em mim e por sempre me apoiarem e impulsionarem a seguir em frente;

À equipe com a qual tive a honra de trabalhar: Rafael Sepúlveda, Camila Avelar, Juliana Leite, Mateus Neves, Samuel Félix, Marcos Cruz e Brenno Barreto. Agradeço, e serei sempre grata, por toda ajuda e carinho.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Rio de Janeiro, pela cordialidade e fornecimento gratuito das cepas utilizadas no estudo;

Ao Instituto Gonçalo Moniz (FIOCRUZ Bahia), especialmente à MsC. Bruna, Profa. Dra. Deborah, Dra. Adriana e Dr. Cláudio, pela colaboração que possibilitou o uso de equipamentos, bem como a realização de etapas imprescindíveis do projeto;

À Drogavet e ao Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos da UFBA, pelo fornecimento de antimicrobianos para elaboração de meios de cultura seletivos;

À Profa. Dra. Lia Fernandes, por tudo que representa para mim, e por todo apoio, acolhimento e ensinamentos;

Ao meu grande mestre, Prof. Dr. Maurício Costa, pela oportunidade, confiança e aprendizados;

Aos Laboratórios de Inspeção e Tecnologia de Carnes e Derivados (LABCARNE), de Sanidade Avícola da Bahia (LASAB), de Estudos em Microbiologia de Alimentos (LEMA), e de Pescados e Cromatografia Aplicada (LAPESCA) da UFBA, bem como à todas as suas respectivas equipes técnicas e coordenadores, pela parceria e colaboração;

À Guga e Rodrigo, pelo excelente trabalho realizado, esclarecimentos e por toda ajuda prestada no decorrer destes anos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa, sem a qual não teria sido possível a realização deste estudo;

E a todos aqueles que cruzaram meu caminho ao longo deste doutorado e não estão citados.

Obrigada!

EPÍGRAFE

“ O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. ” –

Guimarães Rosa.

Lactobacillus plantarum E *Lactobacillus rhamnosus* LIVRES E
ENCAPSULADOS INCORPORADOS EM HAMBÚRGUER DE CARNE BOVINA:
UM ESTUDO DOS IMPACTOS E DA VIABILIDADE

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* adicionados na forma livre e encapsulada, sobre as propriedades físico-químicas e microbiológicas de hambúrguer bovino durante 10 dias de armazenamento refrigerado. As cápsulas foram elaboradas por gelificação iônica externa, utilizando alginato de sódio, leite em pó, farinha de banana verde e goma xantana como material de revestimento. Foram preparadas cinco formulações de hambúrguer bovino: C - sem incorporação de probióticos; FLP - adição de *L. plantarum* como células livre; ELP - adição de *L. plantarum* encapsulado; FLR - adição de *L. rhamnosus* como célula livre e ELR - adição de *L. rhamnosus* encapsulado. Durante as condições gastrointestinais simuladas, a cápsula elaborada proporcionou maior proteção aos probióticos em todas as etapas da análise, com contagens finais superiores a 8 log UFC g⁻¹. A adição de cepas probióticas teve um efeito significativo na preservação do parâmetro a* durante o armazenamento do hambúrguer bovino, especialmente no tratamento ELR. A adição também afetou positivamente (P < 0,05) os parâmetros de pH, textura e oxidação lipídica durante o armazenamento. A incorporação de probióticos, como células livres ou na forma encapsulada, resultou em maiores contagens de bactérias ácido lácticas, *L. plantarum* e *L. rhamnosus* em todos os tratamentos. No entanto, ELP e ELR mantiveram melhor viabilidade (superiores a 8 e 11 log UFC g⁻¹, respectivamente), ao longo de 10 dias de refrigeração. Além disso, a incorporação das cepas probióticas inibiu (P < 0,05) a proliferação de coliformes durante o armazenamento. Os resultados mostraram que *L. plantarum* e *L. rhamnosus* podem ser usados como agentes de biopreservação para aumentar a qualidade de hambúrgueres de carne bovina. Além disso, a adição de probióticos na forma encapsulada mostrou-se o método mais eficaz para melhorar a viabilidade probiótica durante o armazenamento refrigerado e condições gastrointestinais.

Palavras-chave: Probióticos, produtos cárneos funcionais, gelificação iônica, encapsulação.

Lactobacillus plantarum AND *Lactobacillus rhamnosus* FREE AND
ENCAPSULATED INCORPORATED IN BEEF BURGERS:
A STUDY OF IMPACTS AND VIABILITY

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* addition as free cells and in encapsulated forms, on the physicochemical and microbiological properties of beef burgers during 10 days of refrigerated storage. The capsules were prepared by external ionic gelation, using sodium alginate, powdered milk, green banana flour and xanthan gum as the coating material. Five formulations of beef burgers were prepared: C - without probiotic incorporation; FLP - addition of *L. plantarum* as free cells; ELP - addition of encapsulated *L. plantarum*; FLR - addition of *L. rhamnosus* as free cells; and ELR - addition of encapsulated *L. rhamnosus*. During the simulated gastrointestinal conditions, the elaborated capsule also provided greater protection for probiotics in all stages of the analysis, with final counts greater than 8 log CFU g⁻¹. The addition of probiotic strains had a significant effect on the preservation of a* parameter during the storage of beef burgers, especially in ELR treatment. The addition of *L. plantarum* and *L. rhamnosus* also affected positively (P < 0,05) the pH, texture and lipid oxidation parameters during the storage. The incorporation of probiotics as free cells or in encapsulated form resulted in higher counts of lactic acid bacteria, *L. plantarum* and *L. rhamnosus* in all treatments. However, ELP and ELR maintained higher viability (more than 8 and 11 log CFU g⁻¹, respectively) over 10 days of refrigerated storage. Furthermore, the incorporation of probiotic strains inhibited (P < 0.05) the proliferation of coliforms during storage. The results showed that both *L. plantarum* and *L. rhamnosus* can be used as a biopreservative agent to extend the quality of beef burgers. In addition, the addition of probiotics in encapsulation form showed to be the most effective method to improve the probiotic viability during refrigerated storage and simulated gastrointestinal conditions.

Keywords: Probiotics, functional meat products, ionic gelation, encapsulation.

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Representação da técnica de gelificação iônica externa	39
Figura 2	Cápsulas de alginato formadas pela técnica de gelificação iônica externa	40
Figura 3	Fluxograma geral da produção das cápsulas	42
Figura 4	Incorporação dos microrganismos probióticos na massa cárnea ...	46
Figura 5	Aspectos morfológicos da cápsula com matriz de alginato, leite em pó, farinha de banana verde e goma xantana	53
Figura 6	Superfície da cápsula após liofilização. Aspecto morfológico da cápsula de <i>L. plantarum</i> após processo de liofilização por microscopia eletrônica de varredura (35x)	54
Figura 7	Aspecto visual de hambúrgueres com incorporação dos microrganismos probióticos após 10 dias de armazenamento	59
Figura 8	Contagem de bactérias aeróbias mesófilas viáveis em hambúrgueres com adição de <i>L. plantarum</i> e <i>L. rhamnosus</i> durante o armazenamento refrigerado	68
Figura 9	Contagem de bactérias ácido lácticas (BAL) em hambúrgueres com adição de <i>L. plantarum</i> e <i>L. rhamnosus</i> durante o armazenamento refrigerado	71
Figura 10	Contagem seletiva de <i>L. plantarum</i> em hambúrgueres com adição de <i>L. plantarum</i> e <i>L. rhamnosus</i> durante o armazenamento refrigerado	73
Figura 11	Contagem seletiva de <i>L. rhamnosus</i> em hambúrgueres com adição de <i>L. plantarum</i> e <i>L. rhamnosus</i> durante o armazenamento refrigerado	74

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Exemplos de efeitos benéficos cepa-específicos atribuídos à ingestão de microrganismos probióticos	21 e 22
Tabela 2 Microrganismos utilizados em produtos à base de carne como bioprotetores e / ou culturas probióticas	27 e 28
Tabela 3 Condições de processamento usadas em cada etapa da digestão simulada	45
Tabela 4 Formulação dos hambúrgueres com incorporação de <i>L. plantarum</i> e <i>L. rhamnosus</i>	47
Tabela 5 Diâmetro médio e eficiência de encapsulação das partículas de alginato, leite em pó, goma xantana e farinha de banana verde produzidas por extrusão	51
Tabela 6 Viabilidade de <i>L. plantarum</i> e <i>L. rhamnosus</i> , livres e encapsulados, expostos a condições gastrointestinais simuladas, em 0, 90, 110 e 200 minutos	56
Tabela 7 Parâmetros instrumentais de cor (L*, a*, b*) da carne de hambúrguer com adição de <i>L. plantarum</i> e <i>L. rhamnosus</i> durante o armazenamento a 4 ° C	58
Tabela 8 pH da carne de hambúrguer com adição de <i>L. plantarum</i> e <i>L. rhamnosus</i> durante o armazenamento a 4 ° C	62
Tabela 9 Parâmetros de textura de hambúrgueres com adição de com adição de <i>L. plantarum</i> e <i>L. rhamnosus</i>	63
Tabela 10 Oxidação lipídica (TBARS) de hambúrgueres com adição de <i>L. plantarum</i> e <i>L. rhamnosus</i> no período de 10 dias de refrigeração	65

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. HIPÓTESES	18
4. REVISÃO DE LITERATURA	19
4.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS	19
4.2 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS	19
4.2.1 GÊNERO LACTOBACILLUS	23
4.3 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS EM ALIMENTOS	25
4.3.1 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS EM PRODUTOS CÁRNEOS	25
4.4 ENCAPSULAÇÃO	30
4.4.1 ENCAPSULAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.....	31
4.4.2 ENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS.....	32
4.4.3 MATERIAIS DE CÁPSULA.....	33
4.4.3.1 ALGINATO.....	33
4.4.3.2 AMIDO RESISTENTE.....	34
4.4.3.3 GOMA XANTANA.....	36
4.5 TÉCNICAS PARA ENCAPSULAÇÃO.....	37
4.5.1 EXTRUSÃO/GELIFICAÇÃO IÔNICA EXTERNA	38
5. MATERIAL E MÉTODOS	41
5.1 PREPARO DAS CULTURAS	41
5.2 PROCEDIMENTO DE ENCAPSULAÇÃO	41
5.3 TAMANHO DAS CÁPSULAS E RENDIMENTO DA ENCAPSULAÇÃO	43
5.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÁPSULAS POR MICROSCOPIA	43
5.5 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA ÀS CONDIÇÕES SIMULADAS DO TRATO GASTROINTESTINAL	44
5.6 PRODUÇÃO DOS HAMBÚRGUERES	45

5.7	ANÁLISES	48
5.7.1	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	48
5.7.2	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	49
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
6.1	CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS	51
6.1.1	TAMANHO DAS CÁPSULAS E RENDIMENTO DA ENCAPSULAÇÃO	51
6.1.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÁPSULAS POR MICROSCOPIA	53
6.1.3	AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA ÀS CONDIÇÕES SIMULADAS DO TRATO GASTROINTESTINAL	55
6.2	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DE HAMBÚRGUER COM ADIÇÃO DE MICRORGANISMOS	57
6.2.1	PARÂMETROS DE COR	57
6.2.2	ANÁLISE DE pH	61
6.2.3	ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA	63
6.2.4	OXIDAÇÃO LIPÍDICA	64
6.3	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE HAMBÚRGUER COM ADIÇÃO DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS.....	67
6.3.1	CONTAGEM DE MICRORGANISMOS AERÓBIOS MESÓFILOS.....	68
6.3.2	CONTAGEM DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)	70
6.3.3	CONTAGEM DE <i>L. plantarum</i> E <i>L. rhamnosus</i>	72
6.3.4	CONTAGEM DE MICRORGANISMOS POTENCIALMENTE PATOGENICOS	76
7.	CONCLUSÃO	78
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1. INTRODUÇÃO

O consumo de hambúrguer no Brasil é elevado e se baseia na praticidade, características sensoriais e satisfação que este tipo de produto oferece ao consumidor. No entanto, nos últimos anos, os consumidores têm buscado alimentos que além de saborosos, seguros e nutritivos, possam trazer algum benefício à saúde e ao bem-estar. Essa atual tendência têm impulsionado a reformulação de produtos cárneos, seja através da diminuição de substâncias prejudiciais à saúde, ou da adição de compostos benéficos à mesma (SAAD et al., 2011; GRASSO et al., 2014; MIZI et al., 2019).

Os alimentos de base cárnea constituem excelentes matrizes para o desenvolvimento de alimentos funcionais: atingem a uma ampla gama de consumidores; são versáteis e contêm nutrientes intrínsecos de alta qualidade. Assim, diversos estudos vêm sendo realizados com adição de bactérias probióticas em produtos cárneos, com o intuito de caracterizá-los como alimentos funcionais e aumentar o valor nutricional (BEN SLIMA et al., 2020; PAVLI et al., 2020). Ademais, a incorporação de cepas probióticas em produtos cárneos pode inibir a proliferação de microrganismos deterioradores e patogênicos, além de melhorar os parâmetros sensoriais e prolongar a vida de prateleira dos produtos durante o armazenamento (TRABELSI et al., 2019).

Probióticos são “microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do consumidor” (FAO/WHO, 2002; HILL et al., 2014). Os principais microrganismos probióticos empregados com sucesso na reformulação de produtos cárneos pertencem aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Porém, atualmente diversos outros gêneros como *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces*, *Staphylococcus* e *Bacillus* estão sendo utilizados por apresentarem benefícios comprovados (BOMDESPACHO et al., 2014; JAFARI et al., 2017).

Entretanto, o maior desafio na incorporação de probióticos em produtos cárneos está em manter a viabilidade das bactérias durante a elaboração e armazenamento até o consumo do produto. Dessa forma, a produção de produtos cárneos probióticos requer superar a barreira do processamento tecnológico, como o uso de aditivos e tratamento térmico, bem como a microbiota da carne (DE VOS et al., 2010; GRANATO et al., 2010; DE PRISCO & MAURIELLO, 2016). Além do exposto, estudos demonstram que a viabilidade destes microrganismos é baixa quando são adicionados como células livres em alimentos (BILENLER, KARABULUT & KANDOGAN, 2017; CAVALHEIRO et al., 2019a).

Nesse contexto, o encapsulamento surge como uma alternativa para a proteção dos microrganismos probióticos a serem incorporados em alimentos. O emprego dessa tecnologia, além de proteger o conteúdo, fornece liberação controlada do material, aumentando a sobrevivência das células probióticas em diversos produtos (SAAD et al., 2011). Assim, tem sido sugerida como um dos

métodos mais eficientes para manter a viabilidade e estabilidade das bactérias durante a produção, armazenamento e consumo dos alimentos, sendo capaz de ampliar as taxas de sobrevivência de microrganismos probióticos em até 95% (KRASAEKOOPT, BHANDARI E DEETH, 2003; CORBO et al., 2016; DE PRISCO E MAURIELLO, 2016).

Dentre as técnicas existentes para a encapsulação de microrganismos probióticos destaca-se a gelificação iônica externa, por ser de fácil execução, baixo custo e apresentar alta eficiência. O biopolímero, alginato de sódio, é a substância mais amplamente utilizada como material encapsulante, uma vez que forma uma matriz atóxica que protege os ingredientes ativos sensíveis às altas temperaturas (GOH, HENG & CHAN, 2012; CAVALHEIRO et al., 2015). Entretanto, a principal desvantagem do gel formado pelo alginato é a porosidade, que pode afetar tanto a liberação quanto a proteção do microrganismo encapsulado (GOUIN, 2004). Em alguns estudos o problema foi solucionado através da adição de outros compostos, como inulina, quitosana, *whey protein*, goma xantana e amido resistente na matriz de alginato, reduzindo o tamanho dos poros e promovendo maior estabilidade (KRASAEKOOPT E WATCHARAPOKA, 2014; CHEN et al., 2017; ETCHEPARE et al., 2016a; ETCHEPARE et al., 2020).

O amido resistente é uma pequena fração de amido caracterizada por resistir à digestão no intestino delgado, cuja principal fonte é a farinha de banana verde, amplamente produzida no Brasil (ENGLYST et al., 1996; OVANDO-MARTINEZ et al., 2009). A goma xantana, por outro lado, é um exo-polissacarídeo de origem microbiana produzido industrialmente pela bactéria *Xanthomonas campestris* (PALANIRAJ & JAYARAMAN, 2011). O primeiro fornece eficiência no revestimento e preenchimento de espaços vazios entre os grânulos de alginato, a segunda aumenta a resistência à degradação em vários níveis de pH (HABIBI & KHOSRAVI DARANI, 2017; ASHWAR et al., 2018). Entretanto, não há relatos da avaliação do potencial protetivo conferido por cápsulas formuladas pela associação de alginato de sódio, farinha de banana verde e goma xantana.

Dessa forma, a encapsulação de bactérias probióticas, utilizando compostos de baixo custo e de alta disponibilidade no mercado nacional, se apresenta como alternativa econômica e tecnologicamente viável, permitindo a incorporação destes microrganismos em produtos cárneos. Diante da notoriedade que a elaboração de produtos cárneos funcionais assumiu nas pesquisas na área de tecnologia de alimentos, o desenvolvimento de hambúrguer com adição de cepas potencialmente probióticas se destaca como diferencial dessa pesquisa.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

- Produzir, caracterizar e avaliar a estabilidade das cápsulas de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* obtidas através da técnica de gelificação iônica externa; bem como aplicá-los na forma livre e encapsulada em hambúrguer de carne bovina, avaliando os impactos sobre as características físico-químicas e microbiológicas e, sobre a viabilidade dos probióticos incorporados durante o processamento e armazenamento refrigerado do hambúrguer.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Primeira etapa: avaliação e caracterização da cápsula.

- Encapsular *L. plantarum* e *L. rhamnosus* através da técnica de gelificação iônica externa, utilizando alginato, leite em pó, farinha de banana verde e goma xantana como materiais de parede;
- Avaliar o tamanho, eficiência de encapsulação e morfologia das cápsulas produzidas;
- Verificar a estabilidade das cápsulas em diversas condições de pHs, simulando as condições do trato gastrointestinal humano;

Segunda etapa: produção e avaliação dos efeitos no produto.

- Elaborar hambúrgueres com incorporação de *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, livres e encapsulados;
- Verificar o efeito da incorporação de *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, livres e encapsulados sobre as características físico-químicas e microbiológicas no hambúrguer durante o processamento e armazenamento sob refrigeração;
- Acompanhar a viabilidade de *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, livres e encapsulados incorporados no produto durante o período de tempo de 10 dias sob refrigeração.

3. HIPÓTESES

- As bactérias probióticas encapsuladas com alginato de sódio, leite em pó, farinha de banana verde e goma xantana apresentam melhor viabilidade do que as células livres ao longo do tempo de armazenamento do hambúrguer sob refrigeração;
- O encapsulamento confere maior proteção às células de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* frente à simulação ao trato gastrointestinal;
- A encapsulação é uma alternativa eficiente para a incorporação de microrganismos probióticos em produtos cárneos crus, garantindo a manutenção da viabilidade celular, e apresentando impactos positivos sobre a qualidade tecnológica dos produtos.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Nos últimos anos, a indústria alimentícia investiu em tecnologia para a produção de alimentos motivada pelo desafio de atender a uma nova demanda do mercado consumidor. A expansão do interesse pelo papel ativo dos alimentos na prevenção de doenças e promoção de bem-estar, definiu um novo perfil de consumidores, que atualmente buscam por alimentos que além de saborosos, seguros e nutritivos, possam trazer algum benefício à sua saúde. Como resultado, surgiu um novo conceito de alimentação e, para atender essa necessidade, foi proposta a classe dos alimentos funcionais (GRANATO et al., 2010; SAAD et al., 2011; GRASSO et al., 2014).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define como alimento com alegação de propriedade funcional aquele que além das características nutricionais conhecidas, confere efeitos favoráveis ao metabolismo e fisiologia do organismo, resultando em benefícios clínicos comprovados à saúde. Entretanto a legislação brasileira não permite alegações de efeitos benéficos associados à cura ou prevenção de doenças (BRASIL, 1999).

As principais categorias de alimentos funcionais incluem produtos para redução do colesterol, melhoria da saúde intestinal e produtos para a suplementação de vitaminas e minerais. Alimentos enriquecidos com fibras, cálcio, vitaminas, produtos destinados ao fornecimento de energia, e alimentos funcionais probióticos estão entre os mais consumidos no Brasil e no mundo (GRANATO et al., 2010; TRIPATHI & GIRI, 2014).

4.2 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

O termo probiótico, surgiu no início do século 20, quando o cientista Élie Metchnikoff levantou a hipótese de que o consumo regular de microrganismos benéficos em produtos lácteos fermentados estava associado à melhoria de saúde e longevidade das populações camponesas búlgaras (ANUKAM; REID, 2007). Entretanto apenas a partir da década de 60 os primeiros conceitos começaram a ser propostos e discutidos (KUMAR; VIJAYENDRA;

REDDY, 2015). Atualmente, entende-se que probióticos são microrganismos vivos, cuja ingestão regular e em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro, através da modulação da microbiota intestinal (FAO/WHO, 2002; HILL et al., 2014).

Para que um microrganismo seja considerado e utilizado como probiótico é necessário que atenda uma série de características para a garantia da segurança, potencial funcional e tecnológico. Os requisitos de segurança incluem especificações como origem, não patogenicidade e ausência de genes de resistência a antimicrobianos. Dentre as exigências funcionais estão a capacidade de aderir e colonizar o intestino do hospedeiro, bem como de sobreviver às condições do trato gastrointestinal e promover os efeitos benéficos à saúde a que se propõem. E os aspectos tecnológicos, por sua vez, estão relacionados à capacidade de manutenção da viabilidade celular durante o processamento e estabilidade no armazenamento dos alimentos em que são incorporados (FAO/WHO, 2002; BRASIL, 2018; BINDA et al., 2020).

Estudos comprovam o efeito benéfico do consumo de probióticos na prevenção de diversas doenças, tais como: infecções gastrointestinais, osteoporose, arteriosclerose, cardiopatias, infecções urogenitais e alguns tipos de câncer (DOUGLAS & SANDERS, 2008; KUMMAR et al., 2010; GRANATO et al., 2010). Outros relatam, também, ação no controle da obesidade, estimulação do sistema imune, regulação intestinal e melhoria dos quadros de diarreia causados por intolerâncias alimentares, infecções, doenças inflamatórias do intestino ou quimioterapia (NISSEN et al., 2009; AGGARWAL; SWAMI & KUMAR, 2013; MOUNTS et al., 2015; ROUXINOL-DIAS et al., 2016). Além dos benefícios à saúde, a incorporação de cepas probióticas em alimentos pode inibir a proliferação de microrganismos deterioradores e patogênicos, melhorando os parâmetros sensoriais, bem como prolongando a vida de prateleira dos produtos (TRABELSI et al., 2019).

Embora os mecanismos de ação dos probióticos não tenham sido completamente elucidados, sabe-se que a proteção conferida está relacionada com o equilíbrio e manutenção da microbiota intestinal saudável (SÁNCHEZ et al., 2017). Os efeitos no organismo do hospedeiro acontecem tanto pela interação direta dos microrganismos ingeridos (através da exclusão competitiva, em que os probióticos competem por sítios de adesão e nutrientes com os microrganismos patogênicos), como também pela ação indireta dos metabólitos produzidos no alimento durante a fermentação (DE VRESE & SCHEZENMEIR, 2008; TRIPATHI & GIRI, 2014). Independentemente do mecanismo envolvido é importante mencionar que os benefícios são cepa-específicos (Tabela 1) (SHAH, 2007) e dependentes da quantidade de células probióticas viáveis que chegam ao intestino. Por essa razão, para que os benefícios

sejam garantidos é necessário consumir alimentos probióticos regularmente e em quantidades adequadas (DE VRESE & SCHEZENMEIR, 2008; BRASIL, 2018).

Tabela 1 – Exemplos de efeitos benéficos cepa-específicos atribuídos à ingestão de microrganismos probióticos.

Continua		
Efeitos benéficos	Cepa probiótica	Referência
Efeitos no Trato Gastrointestinal	<i>B. lactis</i> (HN019)	
	<i>L. reuteri</i> (DSN 17938)	Douglas & Sanders
	<i>B. coagulans</i> (GBI-30)	(2008); Bixquert
	<i>L. rhamnosus</i> GG (LGG)	(2009); Hempel et al.,
	<i>L. casei</i> DN114001	(2012); Brasil (2017)
	<i>L. plantarum</i> 299v	
Efeito hipocolesterolêmico	<i>L. acidophilus</i> (L1)	Aggarwal; Swami &
	<i>L. acidophilus</i> (ATCC 43121)	Kumar (2013)
Efeito anti-obesidade	<i>L. rhamnosus</i> (PL60, GGMCC)	Aggarwal; Swami &
	<i>L. gasseri</i> (LG2055, BNR17)	Kumar (2013);
	<i>B. longum</i> (BB536)	Mounts et al. (2015); Rouxinol-Dias et al. (2016)
Efeito anticarcinogênico	<i>L. plantarum</i> (L-137, JCM 1551, KLAB21, 2592)	Kumar et al. (2010)
	<i>L. casei</i> (LC9018)	

Tabela 1 – Exemplos de efeitos benéficos cepa-específicos atribuídos à ingestão de microrganismos probióticos.

Efeitos benéficos	Cepa probiótica	Conclusão
		Referência
	<i>B. adoleascentis</i> (ATCC 15703)	
	<i>B. longum</i> (ATCC 15708)	
Modulação imunológica	<i>B. lactis</i> HN019	Douglas & Sanders (2008); Nissen et al., (2009); Yang et al., (2019).
	<i>B. lactis</i> Bb-12	
	<i>L. casei</i> DN114001	
	<i>L. plantarum</i> PCS26	
	<i>L. plantarum</i> 200655	
Atividade antioxidante	<i>L. rhamnosus</i> 6134	Liu et al., (2018); Yang et al., (2019); Nedelcheva et al., (2010)
	<i>L. plantarum</i> 200655	
	<i>L. plantarum</i> 2415	

B. = *Bifidobacterium*; *L.* = *Lactobacillus*

Fonte: construída a partir das literaturas levantadas no PubMed, entre 2017 e 2020 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>

Segundo Ouwehand (2017) a dose mínima diária necessária para que efetivamente os probióticos possam proporcionar seus benefícios, sofre a influência de vários fatores, entre os quais a espécie do microrganismo ingerido. Entretanto é consenso que para alcançar as propriedades probióticas é necessário consumir diariamente 100 g ou 100 mL de um produto que contenha 10^6 a 10^7 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama ou mililitro (NULKAEKUL et al., 2012; TRIPATHI & GIRI, 2014). Essa quantidade garante que a ingestão diária de células probióticas se mantenha entre 10^8 - 10^9 UFC, estando de acordo com a quantidade mínima de microrganismos probióticos nos produtos prontos para consumo determinada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2008). A legislação brasileira determina ainda que as empresas fabricantes apresentem um laudo comprovando a quantidade mínima exigida dos microrganismos no final do prazo de validade

do produto (BRASIL, 2019a), a fim de verificar se mesmo próximo ao vencimento o alimento ainda seja capaz de exercer sua funcionalidade probiótica.

As cepas probióticas mais comumente adicionadas aos alimentos pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, no entanto, outros gêneros como *Enterococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Escherichia* e *Saccharomyces* são também utilizados como probióticos (DOUGLAS & SANDERS, 2008; SHARMA & DEVI, 2014).

4.2.1 GÊNERO *LACTOBACILLUS*

Os microrganismos do gênero *Lactobacillus* pertencem a classe das bactérias ácido lácticas (BAL) e compreendem o grupo de maior representatividade na família *Lactobacillaceae*, possuindo mais de 100 espécies e subespécies. Os membros deste gênero são classificados como bastonetes Gram positivos, anaeróbicos facultativos, não esporogênicos, catalase negativos, e estritamente fermentativos. De acordo com as vias metabólicas utilizadas na degradação dos açúcares podem ser classificados ainda como homo ou heterofermentativos (SILVA et al., 2010; GIRAFFA et al., 2010).

As espécies de *Lactobacillus* spp. homofermentativas são capazes de produzir principalmente ácido láctico como composto resultante do metabolismo da glicose e frutose, as heterofermentativas, por sua vez, produzem além do ácido láctico, ácido acético, dióxido de carbono, etanol e outros compostos com atividade antimicrobiana. Neste último grupo, a capacidade de transformar açúcares em múltiplas substâncias é atribuída à produção da enzima fosfoquetolase. Essa enzima permite a conversão de hexoses em pentoses com produção de diacetil e aldeídos, compostos que conferem sabor e aroma desejáveis nos produtos. Devido a essas características, são amplamente utilizados na fermentação de alimentos, e são o principal gênero da composição de produtos com alegação probiótica (DEVRESE & SCHEZENMEIR, 2008; GIRAFFA et al., 2010; SHARMA & DEVI, 2014). As principais espécies do gênero conhecidas como probióticas são *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. casei*, e *L. paracasei* (HEMPEL et al., 2012; AGGARWAL; SWAMI & KUMAR, 2013; SHARMA & DEVI, 2014).

A espécie *Lactobacillus plantarum* se destaca por ser uma BAL heterofermentativa, de linhagem mesofílica, o que confere a capacidade de crescimento em temperaturas entre 15 e 45°C. Além disso, apresenta melhor desenvolvimento em ambiente com teor de cloreto de

sódio de 4 a 6%, e com valores de pH de entre 4 a 9 (SOMBOON et al., 1992). Devido a estas características, possui potencial para crescimento em uma diversidade de nichos ecológicos, tendo sido isolado a partir de leites, carnes, peixes, produtos fermentados, como também do trato gastrointestinal de humanos e animais. Quando ingerido, o *L. plantarum* é capaz de resistir às condições fisiológicas gastroentéricas, sobrevivendo ao baixo pH estomacal e a ação dos sais biliares (SIEZEN et al., 2012; EMSER et al., 2017). Essa capacidade permite a manutenção da viabilidade celular e o favorecimento da colonização intestinal, e conseqüentemente, a promoção dos seus efeitos benéficos, como a redução dos sintomas intestinais (náuseas, diarreia, dor, flatulência, distensão abdominal) e estimulação do sistema imune (BIXQUERT, 2009; NISSEN et al., 2009).

Lactobacillus rhamnosus faz parte do “Grupo *Lactobacillus casei*”, diferenciando-se bioquimicamente das espécies *L. casei* e *L. paracasei*, pela capacidade de fermentar ramnose. *L. rhamnosus* é comumente utilizado como cultura iniciadora de fermentação, sendo de grande importância na indústria alimentícia. A espécie tem caráter heterofermentativo e mesofílico, apresentando temperatura ótima de crescimento entre 30 °C a 40 °C. É encontrada naturalmente no trato gastrointestinal e vaginal, como componente da microbiota, e também em diversos produtos lácteos e cárneos (DE VRESE & SCHEZENMEIR, 2008; REALE et al., 2015).

Os efeitos benéficos atribuídos ao consumo de *L. rhamnosus* estão associados primariamente à prevenção e suporte no tratamento de afecções intestinais (DOUGLAS & SANDERS, 2008). Entretanto também estão relacionados com efeitos contra a obesidade em humanos, demonstrando eficiência na perda de peso de mulheres submetidas a restrição alimentar supervisionada com suplementação com o probiótico durante 24 semanas (SANCHEZ et al., 2014; ROUXINOL-DIAS et al. 2016).

Ademais, do ponto de vista tecnológico, ambas espécies apresentam potencial bioprotetor para aplicação na indústria de alimentos, uma vez que resultam na inibição da carga microbiana deteriorante e/ou patogênica, melhorando a qualidade do produto. Os efeitos inibitórios de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* são atribuídos à produção de diversos metabólitos antimicrobianos decorrente do processo heterofermentativo destas bactérias, como ácido láctico e bacteriocinas (SARIKA et al., 2010; SILVA SABO et al., 2014; TRABELSI et al., 2019).

4.3 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS EM ALIMENTOS

Os probióticos representam o principal grupo de alimentos funcionais, constituindo cerca de 60 – 70% de todo o mercado mundial destes produtos (TRIPATHI & GIRI, 2014). Essa representatividade reflete uma conscientização sobre os benefícios dos microrganismos probióticos, e a busca dos consumidores por produtos que garantam estas propriedades. *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. destacam-se por serem os principais microrganismos probióticos utilizados nos mais diversos produtos funcionais no mundo (SHARMA & DEVI, 2014; TRIPATHI & GIRI, 2014).

Produtos lácteos, sobretudo iogurtes e leites fermentados, são os alimentos onde os microrganismos probióticos são mais comumente incorporados a fim de agregar características funcionais (GRANATO et al., 2010). Atualmente, o leite continua sendo a principal matriz utilizada no desenvolvimento de produtos probióticos, sobretudo devido a sua composição e facilidade de incorporação. Estudos demonstram a diversidade de opções de alimentos funcionais produzidos de base láctea, como a adição de microrganismos probióticos em queijos (DANTAS et al., 2016, SILVA et al., 2018), sorvetes (BALTHAZAR et al., 2017; GUERRA et al., 2018), e também em chocolate (KONAR et al. 2018).

Entretanto, estes produtos não atendem à necessidade de consumidores vegetarianos ou com outras restrições alimentares, a exemplo da intolerância a lactose. Por isso a indústria alimentícia passou a buscar alternativas para o desenvolvimento de produtos funcionais probióticos a partir de matrizes não lácteas. Dentre os alimentos desenvolvidos para atender a esta demanda destacam-se as bebidas produzidas à base de soja, sucos de frutas e produtos cárneos (GRANATO et al., 2010; CAVALHEIRO et al., 2015).

4.3.1 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS EM PRODUTOS CÁRNEOS

A microbiota autóctone da carne é composta principalmente por BAL e *Staphylococcaceae* coagulase-negativas. Membros de ambos os grupos são considerados tecnologicamente importantes para os processos fermentativos naturais em produtos cárneos. Alguns autores defendem que os microrganismos mais promissores para uso como culturas

iniciadoras são os obtidos a partir da microbiota nativa dos produtos fermentados tradicionais (TALON et al., 2007; DALLA SANTA et al., 2014).

Dalla Santa et al. (2014) produziram salames italianos utilizando, como culturas iniciadoras, estirpes de *Lactobacillus plantarum* (Lp503 e Lp341) nativas de embutidos cárneos de fermentação espontânea. Os autores observaram que os salames elaborados cumpriram os requisitos de qualidade microbiológica e de composição do produto. Em estudo realizado para avaliar a microbiota dos salames produzidos com a carne de bovino, cavalo, javali e porco, Settanni et al. (2020) verificaram que espécies nativas de *Lactobacillus* spp. foram as mais encontradas em todos os quatro tipos de salames analisados. Estes resultados reforçam a importância e o potencial do gênero para o desenvolvimento de produtos cárneos fermentados, entretanto apenas a presença destes microrganismos não é capaz de garantir funcionalidade probiótica àquele alimento.

Distintos estudos têm se dedicado à reformulação de produtos cárneos, alguns sugerindo a remoção, redução ou substituição de compostos conhecidos por serem prejudiciais à saúde como gordura e sal, outros propondo a adição de compostos que sejam benéficos como os microrganismos probióticos. Independentemente da proposta, o intuito principal é aumentar o consumo destes produtos por uma parcela da população que busca cada vez mais associar saúde com alimentação. Assim, recentes trabalhos vêm relatando os efeitos da adição de *Lactobacillus* spp. em carne e produtos cárneos, com o objetivo agregar características sensoriais, e principalmente, propriedades funcionais (BLAIOTTA et al., 2018; AYYASH et al., 2019; CAVALHEIRO et al., 2019a; TRABELSI et al., 2019).

A revisão bibliográfica feita por Cavalheiro et al. (2015), traz uma abordagem das possibilidades de aplicação de microrganismos probióticos em produtos cárneos. Os autores relatam que o uso de probióticos torna-se mais promissor em produtos cárneos fermentados não submetidos ao cozimento durante o processamento, como os salames, por exemplo. Blaiotta et al. (2018) verificaram viabilidade da cepa probiótica *Lactobacillus plantarum* 299v, utilizada para a produção de salame probiótico bovino, mesmo após 60 dias de armazenamento. Nestes produtos a cultura probiótica é adicionada na matriz cárnea crua e, uma vez que não passa pelo processo de aquecimento térmico, a manutenção da viabilidade probiótica no alimento é favorecida (CAVALHEIRO et al., 2015).

Embora a maioria dos trabalhos com adição de probióticos seja em produtos cárneos fermentados, atualmente a aplicação de microrganismos probióticos em produtos cárneos cozidos e em carne crua também tem sido explorada (Tabela 2). As pesquisas voltadas para estes alimentos buscam além de proporcionar um aumento da diversidade de produtos cárneos

funcionais, explorar os benefícios tecnológicos dos probióticos como agentes bioprotetores (AYYASH et al., 2019; TRABELSI et al., 2019; PAVLI et al., 2017; BEN SLIMA et al. 2017). O efeito bioprotetor de *Lactobacillus plantarum* TN8 em carne moída foi relatado por Trabelsi et al. (2019). Os autores verificaram que a incorporação da cepa probiótica foi capaz de retardar a oxidação lipídica, melhorar a textura e inibir a proliferação de microrganismos deteriorantes, estendendo a vida útil da carne durante o armazenamento em temperatura de refrigeração (4 °C).

Tabela 2 – Microrganismos utilizados em produtos à base de carne como bioprotetores e / ou culturas probióticas.

			Continua
Produto Carne	Microrganismos	Função	Referência
Salame	<i>L. plantarum</i>	P/Bp	Cavalheiro et al. (2020)
Linguiça frescal	<i>L. plantarum</i> TN8	Bp	Ben Slima et al. (2020)
Embutido fermentado espanhol	<i>L. rhmanosus</i> GG	Bp	Bis-Souza et al. (2020)
Salame	<i>L. plantarum</i> L125	P	Pavli et. al. (2020)
Carne moída crua	<i>L. plantarum</i> TN8	Bp	Trabelsi et al. (2019)
<i>Chorizo</i>	<i>L. plantarum</i>	P/Bp	Cavalheiro et al. (2019a)
Linguiça fermentada de camelo e bovina	<i>L. plantarum</i> KX881772	P/Bp	Ayyash et al. (2019)
Salame	<i>L. rhmanosus</i>	P/Bp	Ünal Turhan et al. (2019)
Camarão cru	<i>E. lactis</i> 4CP3	Bp	Braïek et al. (2019)
Linguiça frescal	<i>L. plantarum</i> TN8 <i>P. acidilactici</i> MA 18/5M	Bp	Ben Slima et al. (2018)

Tabela 2 – Microrganismos utilizados em produtos à base de carne como bioprotetores e / ou culturas probióticas.

Produto Carne	Microrganismos	Função	Conclusão
			Referência
Presunto	<i>L. pentosus</i> L33	P	Pavli et al. (2017)
	<i>L. plantarum</i> B282		
	<i>L. plantarum</i> L125		
Linguiça cozida	<i>B. coagulans</i> ATCC 31284	P	Jafari et al. (2017)
	<i>B. subtilis</i> var. Natto		
	ATCC 15245		
Linguiça frescal	<i>L. plantarum</i> TN8	P/Bp	Ben Slima et al. (2017)
Carne, carne e pele da barriga de tilápia do Nilo	<i>Pediococcus pentosaceus</i> NP6	Bp	Tasaku et al. (2017)

B = Bifidobacterium; L = Lactobacillus; P = Pediococcus e E = Enterococcus

Bp = Bioprotector, P = Probiótico

Fonte: construída a partir das literaturas levantadas no PubMed, entre 2017 e 2020

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>

Entretanto, o maior desafio na incorporação de probióticos em alimentos cárneos está em manter a viabilidade das bactérias durante o processamento e armazenamento até o consumo do produto, sobretudo quando adicionadas na forma de células livres. Algumas tecnologias aplicadas no desenvolvimento de produtos cárneos podem reduzir significativamente a sobrevivência dos microrganismos probióticos no alimento, em virtude das lesões celulares causadas pela aplicação de calor (tratamento térmico) ou estresse osmótico (salga), por exemplo. A aplicação de baixa temperatura durante a armazenagem - conservação pelo frio – é uma tecnologia que apresenta bons resultados para a viabilidade dos microrganismos probióticos. Entretanto as tensões mecânicas proporcionadas pela formação dos cristais de gelo, no processo de congelamento, podem danificar a parede celular das

bactérias probióticas, levando à redução da viabilidade (GRANATO et al., 2010; TRIPATHI; GIRI, 2014; KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015).

Além disso, a perda de viabilidade probiótica durante o trânsito gastrointestinal, onde os principais estressores são a alteração do pH e ação da bile, também devem ser consideradas como obstáculos que os probióticos precisam superar para cumprir seu papel biológico. Dessa forma, a elaboração de produtos cárneos probióticos exige superar as etapas do processamento tecnológico, como o uso de aditivos químicos e o tratamento térmico, bem como as condições fisiológicas naturais ao processo de digestão (DOUGLAS & SANDERS, 2008; GRANATO et al., 2010; DE VOS et al., 2010; DE PRISCO & MAURIELLO, 2016).

Como alternativa para a solução dos entraves tecnológicos, alguns autores sugerem o uso de estirpes nativas isoladas de produtos cárneos cozidos, uma vez que estas cepas teriam a capacidade de crescer em meio aos aditivos alimentares, como os sais de cura, e também tolerar níveis mais elevados de temperatura (RAMIREZ-CHAVARIN et al. 2013; CAVALHEIRO et al., 2015). Ramirez-Chavarin et al. (2013) verificaram que cepas dos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Aerococcus* e *Enterococcus*, isoladas de salsichas cozidas, sobreviveram após a exposição ao tratamento térmico de 70 °C por 30 minutos. A termotolerância inerente a estes microrganismos garantiria a sobrevivência na matriz cárnea após processamento térmico, possibilitando o uso destas cepas como probióticos em produtos cárneos.

Do mesmo modo, algumas técnicas de encapsulamento são relatadas como alternativa para a proteção dos microrganismos probióticos a serem incorporados em alimentos. O emprego dessas tecnologias, além de proteger o conteúdo, fornece liberação controlada do material, garantindo a manutenção da viabilidade nos produtos, bem como a sobrevivência das células bacterianas durante a passagem pelo trato gastrointestinal (SAAD et al., 2011). Assim, a encapsulação de probióticos, tem sido sugerida como um dos métodos mais eficientes para manter a viabilidade e estabilidade das bactérias durante a produção, armazenamento e consumo dos alimentos, sendo capaz de ampliar as taxas de sobrevivência de microrganismos probióticos em até 95% (KRASAEKOOPT, BHANDARI E DEETH, 2003; CORBO et al., 2016; DE PRISCO & MAURIELLO, 2016).

4.4 ENCAPSULAÇÃO

Os primeiros estudos na área da encapsulação datam de 1930, quando o pesquisador Barret K. Green, desenvolveu um papel impregnado de microcápsulas contendo tinta, em substituição ao papel carbono. A liberação da tinta encapsulada ocorria ao se pressionar o papel durante a escrita, o que promovia o rompimento das microcápsulas. Desde então, pesquisas passaram a utilizar o mesmo princípio para a encapsulação de outros compostos em diversos setores industriais, sobretudo, farmacêutico e alimentício (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2017).

Encapsulação é definida como uma tecnologia de empacotamento de ingredientes sólidos, líquidos ou gasosos em matrizes protetoras. A técnica envolve o revestimento de um material sensível por finas camadas poliméricas, formando cápsulas que fornecem proteção contra as condições ambientais adversas e garantem a liberação do conteúdo de forma controlada (RATHORE et al., 2013; DIAS, FERREIRA, & BARREIRO, 2015). A técnica se baseia no modelo celular, onde a membrana citoplasmática, além de proteger as organelas, controla todo o fluxo de entradas e saídas de substâncias na célula. As cápsulas, de modo análogo, funcionam como a membrana das células, atuando como um agente protetor para substâncias diversas e permitindo a liberação do conteúdo no local adequado (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2017).

A estrutura da cápsula compreende a camada externa (encapsulante) e a interna (encapsulado). O composto a ser encapsulado recebe o nome de material principal, agente ativo, carga útil, preenchimento ou fase interna. Por outro lado, o material encapsulante, é denominado de membrana, material de parede, invólucro, matriz, fase externa ou, ainda, material transportador (ZUIDAM & SHIMONI, 2010).

Existem diversas técnicas empregadas para a encapsulação de compostos, distribuídas de acordo com a natureza (física, química ou físico-química) da reação entre o material de parede e a carga útil. Dentre as técnicas mais utilizadas têm-se a extrusão, coacervação, *spray drying*, *spray chilling*, coacervação complexa, recobrimento em leito fluidizado e lipossoma. A escolha do método depende do objetivo da encapsulação, aplicação industrial, bem como dos materiais de revestimento e de preenchimento (DIAS, FERREIRA, & BARREIRO, 2015; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2017).

O material empregado como revestimento é determinante para a funcionalidade da cápsula, uma vez que são as características dos materiais de parede que irão definir os

mecanismos de liberação do agente ativo. Invólucros insolúveis em água, como gorduras, liberam a substância encapsulada através de processos que promovam o derretimento ou desintegração. Os solúveis em água, por sua vez, liberam o conteúdo em contato com a água durante a mastigação e digestão. Portanto a capacidade de proteção, promoção da estabilidade e liberação controlada do composto encapsulado estão diretamente relacionados com a composição estrutural das cápsulas (SAAD et al., 2011; DE PRISCO & MAURIELLO, 2016).

Além de refletir nas propriedades funcionais das cápsulas, a seleção do material de parede, é de suma importância pois reflete também sobre as propriedades morfológicas, desempenhando papel importante na determinação do tamanho, textura, e porosidade das cápsulas (ZUIDAM & SHIMONI, 2010; DE PRISCO & MAURIELLO, 2016). O tamanho das cápsulas é bastante variável apresentando valores na faixa de 10 µm a 3 mm de diâmetro. Isso porque sofre influência de outros fatores, como o tipo de técnica utilizada para promover a encapsulação, o diâmetro do bico utilizado para o gotejamento, viscosidade da solução gotejada e a distância entre o bico e a solução solidificante (KRASAEKOOPT, BHANDARI E DEETH, 2003; RATHORE et al., 2013).

Nas indústrias farmacêutica e de alimentos, a versatilidade dessa tecnologia possibilitou a encapsulação de uma ampla gama de substâncias, como extratos vegetais, medicamentos, óleos, compostos voláteis, dentre outros (RATHORE et al., 2013; DIAS, FERREIRA, & BARREIRO, 2015).

4.4.1 ENCAPSULAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

É crescente o interesse no desenvolvimento de pesquisas sobre a incorporação de compostos encapsulados em alimentos. Na indústria alimentícia, os principais objetivos desta estratégia são promover a incorporação de ingredientes em matrizes alimentares conferindo propriedades funcionais aos produtos; mascarar a adição de compostos de sabor ou aroma indesejáveis; possibilitar a liberação controlada em um alvo específico do trato gastrointestinal após a ingestão de alimentos e melhorar a estabilidade dos compostos bioativos contra condições ambientais adversas e armazenamento (DIAS, FERREIRA, & BARREIRO, 2015; CORRÊA-FILHO, MOLDÃO-MARTINS & ALVES, 2019).

A estabilidade conferida através da imobilização do agente ativo, se deve à limitação das interações destes com fatores externos, como o oxigênio e pH, o que retarda as reações que resultam em alterações nos alimentos, como mudança de cor e diminuição do valor nutricional (PASIN; AZÓN & GARRIGA, 2012). De modo similar, a encapsulação de substâncias aromatizantes tende a prolongar o aroma no alimento, uma vez que estes compostos apresentam alta volatilidade quando adicionados na forma livre e são facilmente degradados durante os processos oxidativos. O uso de acidulantes encapsulados conferem maior segurança tecnológica na industrialização de produtos, já que a reação de ácidos com outros componentes do alimento pode resultar em diversos efeitos indesejáveis na textura, cor, sabor, aroma e separação de fases dos ingredientes (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2017).

Dentre os compostos mais frequentemente encapsulados para aplicação na indústria de alimentos, incluem-se compostos fenólicos, carotenoides, óleos essenciais, vitaminas, peptídeos, enzimas, minerais, antocianinas, polifenóis, corantes, aromatizantes, ácidos orgânicos e microrganismos probióticos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2017; CORRÊA-FILHO, MOLDÃO-MARTINS & ALVES, 2019).

4.4.2 ENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS

Nas últimas décadas, essa tecnologia também foi aplicada à imobilização microbiana de células devido a suas inúmeras vantagens sobre outras técnicas de imobilização celular, como maior capacidade de carga celular, maior sobrevivência e aumento da taxa de produção de metabólitos microbianos desejáveis. Assim, a encapsulação de bactérias probióticas tem sido descrita por diversos autores (RATHORE et al., 2013; ETCHEPARE et al., 2016a; ETCHEPARE et al., 2016b; CAVALHEIRO et al., 2019a).

O confinamento de células microbianas dentro de uma matriz polimérica semi-permeável promove o isolamento físico das células do ambiente externo, mantendo um microambiente interno favorável à manutenção da viabilidade celular. O principal foco dos estudos na área de encapsulação de probióticos é a avaliação da proteção conferida pelas cápsulas, aos microrganismos, frente as condições adversas do trato gastrointestinal. Entretanto também são discutidas a composição estrutural das cápsulas, bem como a avaliação dos efeitos à simulação de diferentes processos tecnológicos, como salga, cura e

tratamento térmico (REALE et al., 2015; ETCHEPARE et al., 2016a; ETCHEPARE et al., 2016b; BILENLER, KARABULUT & CANDOGAN, 2017; ETCHEPARE et al., 2020).

Outro aspecto da aplicação da tecnologia de empacotamento de microrganismos probióticos é a biocompatibilidade dos materiais utilizados na composição da cápsula. Dessa forma as substâncias de revestimento não devem causar alterações ao metabolismo das células probióticas, como também não devem causar danos ao organismo do consumidor. Ou seja, o material de parede não pode apresentar citotoxicidade ou propriedades antimicrobianas (COOK et al., 2012).

4.4.3 MATERIAIS DE CÁPSULA

Biopolímeros naturais, como alginato, amido, quitosana e pectina, são os materiais de parede mais empregados para a encapsulação de compostos na indústria de alimentos, uma vez que são substâncias consideradas seguras para o consumo humano. Além disso, a capacidade de proteção aos microrganismos encapsulados, a alta disponibilidade, a biocompatibilidade e o baixo custo são os requisitos que fazem dos biopolímeros, os principais materiais encapsulantes (PASIN, AZÓN & GARRIGA, 2012; DE PRISCO & MAURIELLO, 2016).

Diversas outras substâncias são aprovadas para utilização como agentes encapsulantes na indústria alimentícia e incluem, além dos carboidratos (gomas, celulose e amidos), os lipídios (ácidos graxos, ceras), e proteínas (caseína, gelatina, soro de leite). A variedade de materiais de parede permite a adequação do melhor composto a ser utilizado em função do tipo de substância a ser encapsulada, e do processo de liberação do conteúdo das cápsulas (SAAD et al., 2011; YING et al., 2013; HOMAYOUNI et al., 2014; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2017; ETCHEPARE et al., 2020).

4.4.3.1 ALGINATO

O alginato de sódio é a substância mais amplamente utilizada na encapsulação de bactérias probióticas. É descrito como um biopolímero derivado de algas marinhas,

encontrado na forma de pó branco ou marrom amarelado, insípido, inodoro e frequentemente empregado como estabilizador e espessante em produtos alimentares. É composto, principalmente, por sal de sódio do ácido algínico, ou seja, uma mistura de ácidos poliurônicos composta de resíduos de ácido b-D-manurônico e a-L-gulurônico (GOH, HENG & CHAN, 2012).

A solução de alginato de sódio forma uma matriz atóxica que protege os ingredientes ativos, especialmente microrganismos probióticos, da ação do calor, pH, oxigênio, entre outros fatores a que os alimentos são expostos durante o processamento e armazenamento (PASIN, AZÓN & GARRIGA, 2012; CAVALHEIRO et al., 2015). A técnica de encapsulação utilizando alginato tem sido relatada na imobilização de uma grande variedade de compostos, sendo a liberação controlada do conteúdo é alcançada através de alterações de pH (GOH, HENG & CHAN, 2012).

Entretanto, a principal desvantagem do gel formado pelo alginato é a porosidade, que pode comprometer tanto a liberação controlada, quanto a viabilidade dos microrganismos encapsulados. Em alguns estudos esse problema foi solucionado através da adição de outros compostos, como inulina, quitosana, goma xantana e amido resistente, na solução de alginato reduzindo o tamanho dos poros e promovendo maior estabilidade às cápsulas (GOUIN, 2004; CHEN et al., 2017; ETCHEPARE et al., 2016b).

Etchepare et al. (2016a; 2016b) imobilizaram *Lactobacillus acidophilus* em soluções contendo combinações de alginato com amido resistente e alginato acrescido com amido resistente e quitosana, respectivamente. Em ambos estudos, os autores observaram que embora as partículas de alginato tenham sido eficazes na proteção das culturas, a adição de amido resistente e amido resistente combinado com quitosana, aumentaram o efeito protetivo promovido pela encapsulação, resultando em melhor preservação da viabilidade celular.

4.4.3.2 AMIDO RESISTENTE

A molécula do amido é composta por uma cadeia linear denominada amilose, e uma cadeia pesada e, altamente ramificada, chamada de amilopectina. O termo "amido resistente refere-se à fração linear do amido, caracterizada por resistir à digestão no intestino delgado (ENGLYST et al. 1996).

O amido resistente passa quase que inteiramente pelo intestino delgado, servindo de substrato para a fermentação de microrganismos probióticos no intestino grosso, o que além de favorecer o crescimento e viabilidade dos mesmos, produz ácidos graxos de cadeia curta. Estudos sobre as propriedades prebióticas relacionadas à resistência do amido demonstraram que uma dieta rica em amido resistente está associada ao aumento das populações de *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., e outros gêneros de bactérias probióticas (RODRIGUEZ-CABEZAS et al., 2010; YING et al., 2013).

Devido às suas propriedades funcionais e os impactos positivos para a microbiota intestinal, o amido resistente ganhou atenção da indústria alimentícia nas últimas décadas. Além dos benefícios para a saúde, características como ser um composto de origem natural, apresentar sabor suave, cor branca, possuir baixa capacidade de retenção de água e alta temperatura de gelatinização, são consideradas ideais para a formulação de vários produtos funcionais. Além disso, as propriedades do amido resistente permitem a elaboração de alimentos ricos em fibras prebióticas, sem alterações organolépticas e com melhoria no atributo textura, em comparação com produtos tradicionais de alto teor de fibras (HOMAYOUNI et al., 2014; ASHWAR et al., 2016).

O amido resistente é encontrado naturalmente em diversos grãos de cereais, sementes, batata crua e, principalmente, na banana verde. Amplamente produzida no Brasil, a banana verde e seus derivados, compreendem alimentos amiláceos com alta concentração de compostos não digeríveis, como o amido resistente e polissacarídeos não amiláceos. Dentre os derivados, a farinha de banana verde se destaca como a principal fonte de amido resistente, que representa 17,5% de sua composição (ENGLYST et al., 1996; OVANDO-MARTINEZ et al., 2009). Os produtos alimentares elaborados com adição de farinha de banana verde, além dos benefícios à saúde intestinal, demonstram baixa taxa de hidrólise de carboidratos e podem aumentar a gama de alimentos com baixos índices glicêmicos disponíveis para o consumidor (CHARALAMPOPOULOS et al., 2002; OVANDO-MARTINEZ et al., 2009).

O amido possui eficiência no revestimento e preenchimento de espaços vazios entre os grânulos de alginato, devido a estas propriedades, recentemente, diversas pesquisas têm analisado os efeitos da adição de amido resistente na composição do material de parede para a encapsulação de probióticos (ASHWAR et al., 2018). Estudos relatam que a combinação de amido resistente com materiais de encapsulamento regulares, como alginato de sódio, poderia minimizar a porosidade inerente às cápsulas constituídas apenas por alginato, aumentando a estabilidade e viabilidade das células imobilizadas (YING et al., 2013; MUHAMMAD et al., 2017). Os microrganismos protegidos em cápsulas de alginato combinadas com o prebiótico,

obtiveram melhores taxas de sobrevivência quando submetidos ao congelamento e ensaios de simulação às condições do trato gastrointestinal (ETCHEPARE et al., 2016a; ETCHEPARE et al., 2016b).

4.4.3.3 GOMA XANTANA

Goma é um termo genérico utilizado para designar géis hidrocoloidais que exibem propriedades de ligação com a água e outras substâncias e que, em sua grande maioria, são derivados de plantas. Goma xantana, no entanto, é um exo-polissacarídeo de origem microbiana produzido industrialmente por fermentação pela bactéria *Xanthomonas campestris*. Os polissacarídeos microbianos são compostos por unidades regulares de repetição de açúcares simples. A goma xantana é constituída por unidades repetidas de pentassacarídeos formadas por duas moléculas de glicose, duas de manose e uma de ácido glucurônico (PALANIRAJ & JAYARAMAN, 2011; WANG et al., 2017).

As propriedades reológicas da goma xantana se destacam em relação às outras outras gomas. Esta, se dispersa em fluidos frios e quentes e produzindo rapidamente soluções gelatinosas de alta viscosidade, compatibilidade com sais e estabilidade em altas temperaturas. Além disso, a goma xantana apresenta resistência à degradação em vários níveis de pH, o que permite a manutenção da sua estrutura molecular em soluções ácidas e alcalinas. Essas características fazem da goma xantana um agente espessante e estabilizante, sendo adequada para a formulação de vários alimentos (HABIBI & KHOSRAVI DARANI, 2017).

O uso dessa goma na encapsulação de microrganismos probióticos têm mostrado resultados satisfatórios. Estudos demonstraram que os resultados são ainda mais expressivos em sistemas de co-encapsulação, onde além do alginato e da goma xantana, outros materiais de parede são adicionados à formulação das cápsulas. Nazzaro et al. (2009) relataram que as melhores respostas obtidas nos estudos com goma xantana em sistemas de co-encapsulação estão associadas aos efeitos sinérgicos entre os ingredientes prebióticos e probióticos das cápsulas.

Autores observaram ao avaliarem a eficiência da encapsulação de células probióticas em alginato adicionado de goma xantana e quitosana; e alginato, goma xantana e inulina, que houve melhoria na viabilidade celular nos sistemas de co-participação. Ambos os tipos de cápsulas obtiveram sucesso na alta tolerância ao pH e resistência aos sais biliares, enquanto as

cápsulas de dupla camada de goma xantana mostraram ainda mais eficiência. No entanto, as cápsulas de camada única da goma apresentaram melhor perfil de liberação do conteúdo (NAZZARO et al., 2009; CHEN et al., 2017; SHU et al., 2018).

Estruturalmente, quando comparado com cápsulas de alginato puro, a porosidade e cristalinidade foram alteradas significativamente, obtendo-se uma superfície mais lisa e uniforme, nos sistemas de co-participação com quitosana e amido (SHU et al., 2018; OBEROI et al., 2019). O que demonstra que a adição de goma xantana pode melhorar a estabilidade das cápsulas de alginato, reduzindo a porosidade e, conseqüentemente, fornecendo maior proteção às células probióticas.

4.5 TÉCNICAS PARA ENCAPSULAÇÃO

Diversos métodos podem ser utilizados para a encapsulação de bactérias com propriedades probióticas. Entretanto, estudos destacam a necessidade de avaliar o impacto que a adição de ingredientes bioativos tem sobre a microestrutura dos próprios veículos de encapsulamento e de adequação de uns aos outros. Além disso, a escolha da técnica de encapsulação será dependente do tipo de agente ativo a ser encapsulado, do emprego da cápsula e do tipo de mecanismo de liberação do conteúdo desejado (COOK et al., 2012; GÓMEZ-MASCARAQUE et al., 2018).

Os métodos existentes são classificados de acordo com a forma de imobilização dos compostos bioativos pelo agente encapsulante, que pode ser de natureza química, física ou físico-química. Entre os métodos químicos estão a inclusão molecular e polimerização interfacial. Os métodos físicos englobam a liofilização, secagem por atomização (*spray drying*), atomização a frio (*spray cooling*), gelificação iônica externa (extrusão), leiteo fluidizado e co-cristalização. E, os métodos físico-químicos incluem a coacervação, lipossomas, inclusão molecular e emulsificação seguida de evaporação do solvente (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2017).

Apesar da variedade de técnicas, as principais utilizadas na encapsulação de probióticos são a extrusão e a emulsificação. Isso porque algumas tecnologias, como secagem por atomização, não são adequadas para a imobilização de bactérias probióticas, pois o

emprego de elevadas temperaturas no processo, podem causar a inativação térmica das células (BURGAIN et al. 2011).

Na técnica de extrusão, a encapsulação ocorre através da mistura do material a ser encapsulado com o material encapsulante (alginato) seguido do gotejamento em uma solução solidificante (cloreto de cálcio) formando um gel insolúvel (SMRDEL et al., 2008). Já a técnica de emulsificação consiste na dispersão da solução contendo os microrganismos probióticos e o material encapsulante em um óleo que, sob agitação forma uma emulsão água-em-óleo (W/O) que pode ser tanto permanente quanto temporária. Esta técnica pode produzir cápsulas com tamanhos inferiores a 100 µm (BURGAIN et al., 2011; AHMAD et al., 2019).

Recentes estudos já vêm demonstrando a eficácia de diversas técnicas de encapsulação na proteção de microrganismos probióticos às características adversas de processamento e ao trato gastrointestinal (ETCHEPARE et al., 2016a; ETCHEPARE et al., 2016b; AHMAD et al., 2019; GÓMEZ-MASCARAQUE et al., 2018; ETCHEPARE et al., 2020).

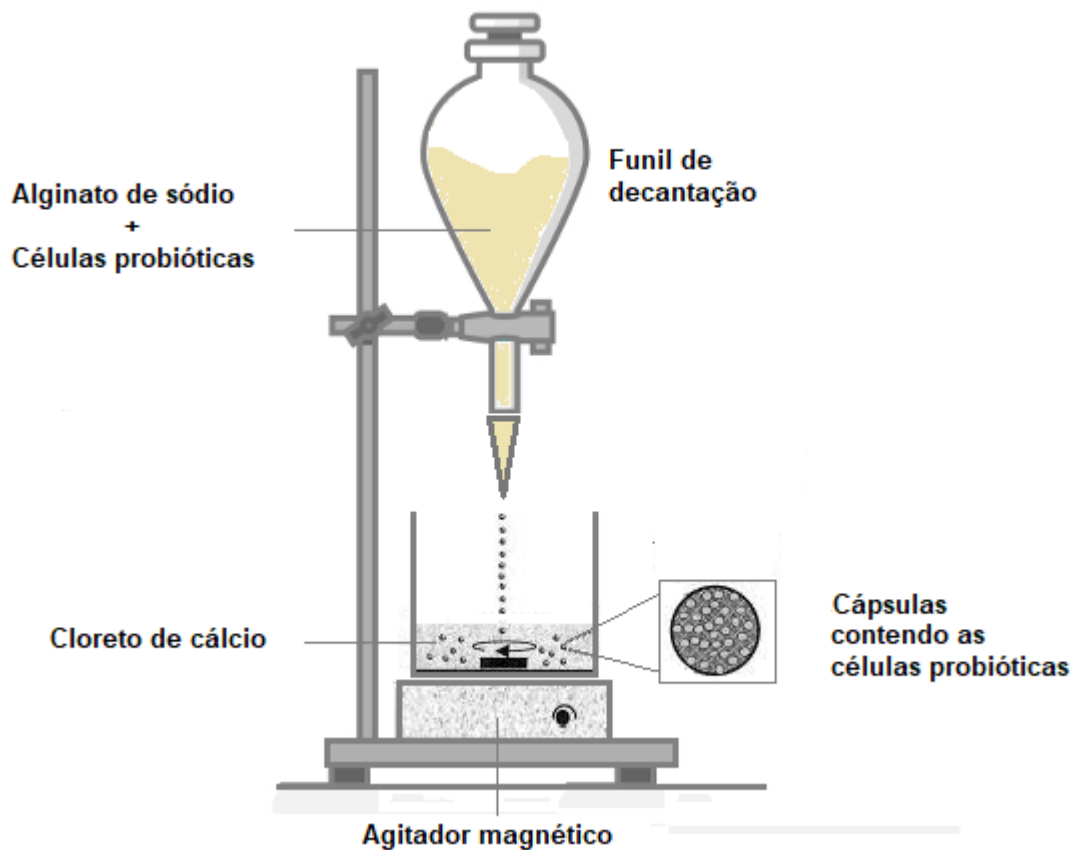
4.5.1 EXTRUSÃO/GELIFICAÇÃO IÔNICA EXTERNA

Dentre as técnicas para encapsulação de microrganismos probióticos, a gelificação iônica externa, também conhecida por extrusão, é mais utilizada (BURGAIN et al., 2011; PASIN, AZÓN & GARRIGA, 2012; CAVALHEIRO et al., 2019a). O método envolve a preparação de uma solução hidrocolóide homogênea (composta por um biopolímero e microrganismos probióticos) e a extrusão gota a gota em uma solução de endurecimento que promove a gelificação, formando as cápsulas (Figura 1) (KRASAEKOOPT, BHANDARI E DEETH, 2003; SMRDEL et al., 2008). Os principais materiais de revestimento utilizados nesta técnica são alginato de sódio, pectina e carragenina, e a principal substância solidificante é o cloreto de cálcio. Os biopolímeros são capazes de formar géis na presença de minerais como cálcio, imobilizando e protegendo as células probióticas com eficiência (CAVALHEIRO et al., 2015).

O processo de gelificação ocorre pela ligação cruzada entre os íons de sódio do alginato com os íons bivalentes de cálcio da solução de endurecimento (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003). A coagulação resultante dessa ligação pode ser promovida de duas formas: por gelificação externa ou interna. A gelificação externa ocorre quando se utiliza cloreto de cálcio como fonte de cálcio adicionada à solução de coagulação, já a gelificação

interna, quando se usa carbonato de cálcio como fonte de cálcio adicionada à solução de alginato. No primeiro caso, a gelificação ocorre principalmente na superfície da partícula e no segundo ocorre a gelificação principalmente no interior das partículas formadas. Entretanto, independentemente do processo de gelificação, os materiais formados, devido ao seu grau de reticulação e funcionalidade iônica, permitem o controle da ingestão de água e, portanto, a liberação do composto bioativo encapsulado (GOH, HENG & CHAN, 2012).

Figura 1 - Representação da técnica de gelificação iônica externa.



Fonte: Autoria própria.

O tamanho das partículas obtidas pela técnica de extrusão varia entre 2 e 6 mm de diâmetro (Figura 2) e depende da viscosidade da solução, diâmetro do bico utilizado para o gotejamento, e a distância entre o bico e a solução de cloreto de cálcio (KRASAEKOOPT, BHANDARI E DEETH, 2003; BURGAIN et al., 2011; RATHORE et al., 2013; GÓMEZ-

MASCARAQUE et al., 2018). Essa característica é particularmente importante para a aplicação de cápsulas em alimentos, uma vez que pode, diretamente, interferir nos parâmetros sensoriais.

Figura 2 – Cápsulas de alginato formadas pela técnica de gelificação iônica externa.



Fonte: Acervo pessoal.

Além da facilidade de execução e baixo custo, a principal vantagem da técnica de extrusão é que ela não promove injúrias às células probióticas, geralmente resultando numa alta eficiência de encapsulação (DE VOS et al., 2010; BURGAIN et al., 2011; PASIN, AZÓN & GARRIGA, 2012; CAVALHEIRO et al., 2015). As taxas de sobrevivência dos microrganismos probióticos encapsulados pela técnica são de até 95% (KRASAEKOOPT, BHANDARI E DEETH, 2003). A técnica da gelificação iônica externa permite ainda que outros materiais de parede sejam adicionados em associação ao alginato, com o intuito de melhorar a estabilidade das cápsulas. Estudos utilizando quitosana e *whey protein* em sistemas de co-encapsulação com o alginato, apresentou resultados de eficiência de encapsulação entre 91 e 97% (DE PRISCO et al., 2015; ETCHEPARE et al., 2020).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 PREPARO DAS CULTURAS

As cepas probióticas *L. plantarum* ATCC 10012 e *L. rhamnosus* ATCC 7469 foram fornecidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Brasil). As cepas probióticas foram reidratadas utilizando 1% (p / v) de inóculo em caldo de Man, Rosa e Sharpe (MRS) (MERCK, Darmstadt, Alemanha), e incubadas a 37 °C por 24 horas. As células foram colhidas por centrifugação a 4000 × g durante 20 min a 4 °C (Heraeus Megafuge 40R, Braunschweig, Alemanha), lavadas duas vezes com solução de peptona a 0,1% estéril e, em seguida, novamente centrifugadas sob as mesmas condições. Por fim, e após a remoção do sobrenadante, as células foram ressuspensas em solução de NaCl (0,9% p / v).

Alíquotas das suspensões celulares de obtidas *L. plantarum* e *L. rhamnosus* foram diluídas em série e contabilizadas através de plaqueamento em agar MRS (MERCK, Darmstadt, Alemanha.) adicionado de Vancomicina (ABL, São Paulo, Brasil) e em ágar *L. plantarum* selective medium (LPSM) (BUJALANCE et al., 2006), apresentando contagens iniciais de 13,39 e 14,73 log UFC mL⁻¹, respectivamente.

Em seguida, as suspensões de células foram divididas em duas partes, sendo uma parte utilizada para encapsulamento e a outra para a incorporação direta no hambúrguer na forma de células livres.

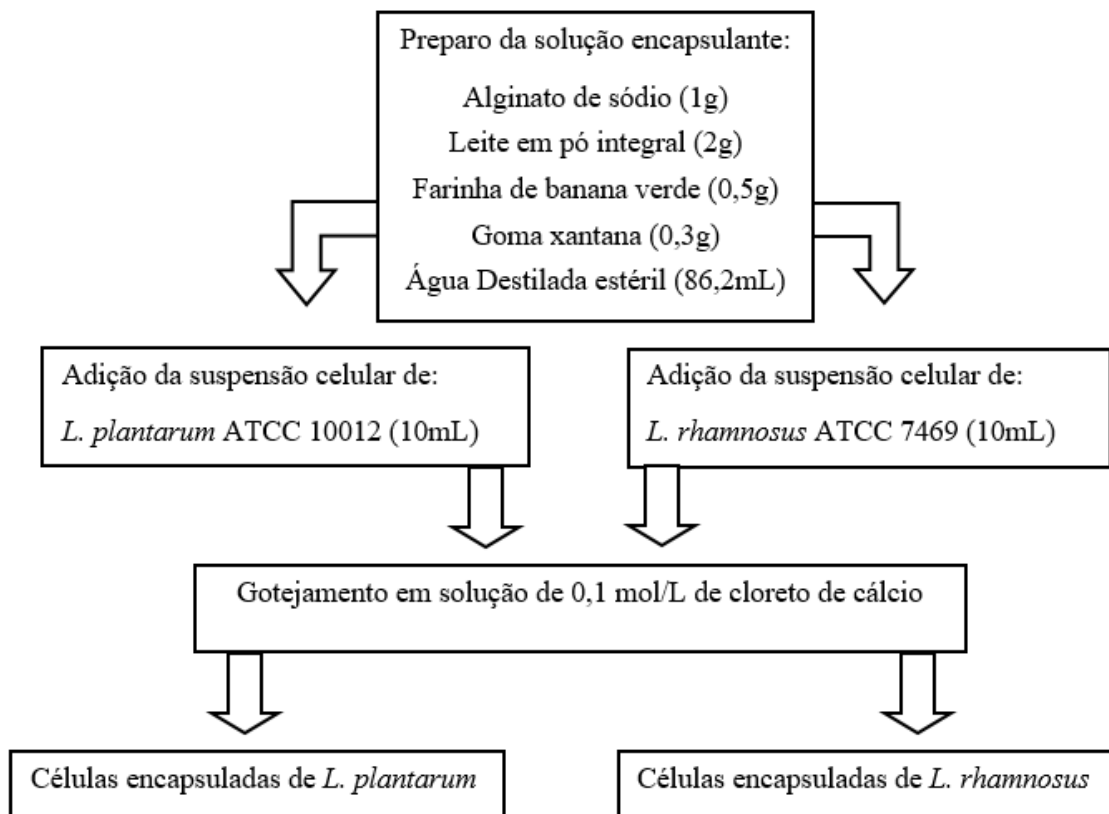
5.2. PROCEDIMENTO DE ENCAPSULAÇÃO

A técnica de encapsulamento por gelificação iônica externa foi realizada conforme metodologia adaptada de Cavalheiro et al. (2019a; 2019b), conforme demonstrado no fluxograma abaixo (Figura 3).

Para cada 100 mL de suspensão foi utilizado 1 g de alginato de sódio (SIGMA-ALDRICH Ltd.,Steinheim, Alemanha), 2 g de leite em pó integral (NESTLÉ, Araçatuba, Brasil), 0,5 g de farinha de banana verde (LEVE CROCK, Piraí do Sul, Brasil), 0,3 g de goma

xantana (LEVE CROCK, Piraí do Sul, Brasil) e 10 mL de cada suspensão celular probiótica em 86,2 mL de água destilada estéril.

Figura 3 – Fluxograma geral da produção das cápsulas.



Fonte: Autoria própria.

Após completa homogeneização, as soluções foram transferidas, individualmente, para um funil de decantação e gotejadas em uma solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de cálcio (SIGMA-ALDRICH Ltd., Steinheim, Alemanha) a partir de uma distância de 10 cm usando um bico de 200 μm de diâmetro. As cápsulas contendo *L. plantarum* e as cápsulas contendo *L. rhamnosus* foram agitadas a 350 rpm por 30 minutos, na solução solidificante, para o endurecimento completo. Posteriormente foram filtradas com filtro estéril, lavadas com água destilada estéril e armazenadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ em recipientes previamente esterilizados, para futuras análises e aplicação na fabricação dos hambúrgueres de carne bovina.

5.3 TAMANHO DAS CÁPSULAS E RENDIMENTO DA ENCAPSULAÇÃO

As cápsulas obtidas estavam na faixa dos milímetros, por esse motivo, os tamanhos das cápsulas foram avaliados em paquímetro (150 mm - 6”, TramontinaPro, Carlos Barbosa, Brasil). Os dados foram coletados a partir de 100 cápsulas de alginato para cada cepa probiótica. Para determinar a viabilidade pós encapsulamento, 1g de cápsula foi solubilizada em 9 mL de tampão fosfato (PBS, 0,1 mol L⁻¹, pH 7,5) como sugerido por Sheu e Marshall (1993). A mistura foi colocada em um agitador (modelo TE-421, Tecnal, Piracicaba, Brasil) sob agitação (100 rpm) à temperatura ambiente por 20 min, e em seguida, submetida a vórtex (modelo K40-1010, Kasvi, Curitiba, Brasil) em alta velocidade para romper o polímero formado e liberar completamente a cultura encapsulada. Um total de 1 mL de cada suspensão obtida foi retirado, diluído e plaqueado em ágar seletivo para *L. rhamnosus* (MRS adicionado de vancomicina) com incubação a 37 °C por 72 h e em ágar seletivo para *L. plantarum* (LPSM) a 37 °C por 72 h. As contagens de células viáveis foram realizadas em triplicatas e expressas em log UFC por mL (THARMARAJ & SHAH, 2003; BUJALANCE et al., 2006).

O rendimento do encapsulamento (RE) expressa a eficiência do aprisionamento e sobrevivência de células viáveis durante o procedimento de encapsulamento e foi calculado como:

$$RE (\%) = \frac{N_{\text{cápsulas}}}{N_{\text{suspensão}}} \times 100$$

onde $N_{\text{cápsula}}$ foram contagens viáveis totais recuperadas de esferas e $N_{\text{suspensão}}$ foram contagens viáveis totais recuperadas em suspensão celular (células livres) (DOHERTY et al., 2011).

5.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÁPSULAS POR MICROSCOPIA

A caracterização microscópica das cápsulas foi obtida por meio de microscopia óptica e eletrônica. A microscopia óptica das partículas úmidas foi realizada utilizando um microscópio (Eclipse Ci, Nikon, Nova Iorque, EUA) com uma câmera digital acoplada (DS-Qi2, Nikon, Nova Iorque, EUA) para captura de imagens. A microscopia eletrônica foi realizada utilizando um microscópio eletrônico de varredura (JSM6390, JEOL, São Paulo,

Brasil). As cápsulas foram liofilizadas, montadas em tocos de alumínio usando uma fita adesiva dupla face e depois revestidas com uma camada fina de ouro para a visualização das estruturas.

5.5 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA ÀS CONDIÇÕES SIMULADAS DO TRATO GASTROINTESTINAL

A viabilidade de alíquotas de 1 mL de solução de células livre e 1 g de cápsulas de *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, foi determinada continuamente em meios simulando as diferentes seções do trato gastrointestinal, de acordo metodologia descrita por Madureira et al. (2011) com adaptações (Tabela 3).

Todas as etapas da análise foram realizadas em incubadora shaker AL-221 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) a uma temperatura constante de 37 °C, para simulação da temperatura do corpo humano. A velocidade de agitação variou em função da etapa, a fim de simular os movimentos peristálticos em cada fase da digestão. Para a etapa gástrica, foi utilizada 130 rpm e, para as fases entéricas (simulação da passagem pelo duodeno e íleo), 45 rpm.

Para a simulação da condição gástrica foi adicionado aos tubos falcons uma solução de HCl 1M até a obtenção de pH de 2,0 e solução de pepsina (pepsin from porcine gastric mucosa P7000, SIGMA-ALDRICH Ltd., Steinheim, Alemanha) na concentração de 3 g L⁻¹. As alíquotas de 1 mL de células livres e de 1 g de cápsulas permaneceram nestas condições por 90 minutos, em constante aquecimento e agitação.

A etapa seguinte, para simular as condições duodenais (fase entérica I), o pH foi ajustado para 5,0 através da adição de solução alcalinizante (KH₂PO₄ 0,05M). Em seguida, foi realizada a adição de pancreatina (pancreatin from porcine pancreas P3292, SIGMA-ALDRICH Ltd., Steinheim, Alemanha) e de sais biliares bovinos (B3883-25G, SIGMA-ALDRICH Ltd., Steinheim, Alemanha), até a obtenção de uma concentração de 0,1 g L⁻¹ e de 1 g L⁻¹, respectivamente, mantendo estas condições durante a incubação por mais 20 minutos.

Finalmente, para a etapa de simulação das condições fisiológicas do íleo (fase entérica II), o pH foi aumentado para 7,5 utilizando a mesma solução alcalina da etapa anterior, e a incubação seguiu-se por 90 minutos em temperatura e agitação constantes.

Alíquotas de 1 mL foram removidas, diluídas em série e plaqueadas em ágar MRS após 90 minutos (fase gástrica), 110 minutos (fase entérica I) e 200 minutos (fase entérica II)

para a determinação da viabilidade das células livres e encapsuladas de *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, frente exposição às condições gastrointestinais. As contagens foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em UFC mL⁻¹ e UFC g⁻¹.

Tabela 3 – Condições de processamento usadas em cada etapa da digestão simulada.

Etapa simulada	Substâncias adicionadas	pH	Agitação	Tempo
Gástrica	Pepsina	2,0	130 rpm	90 min
Entérica I	Pancreatina Sais biliares	5,0	45 rpm	20 min
Enterica II	–	7,5	45 rpm	90 min

Fonte: Autoria própria.

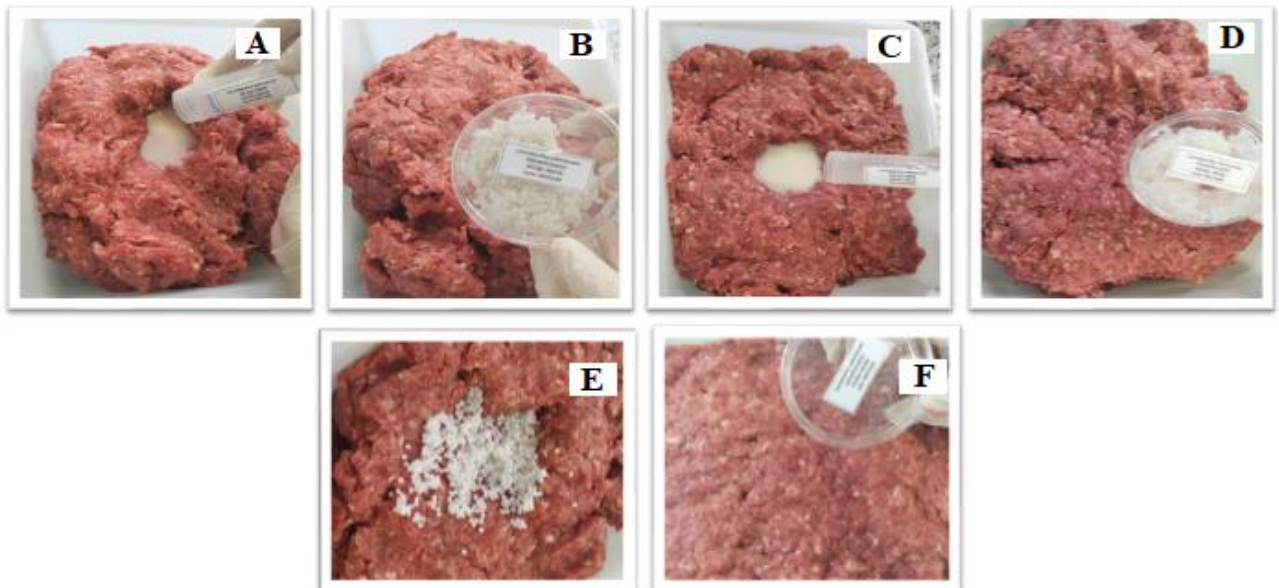
5.6 PRODUÇÃO DOS HAMBÚRGUERES

Os hambúrgueres foram produzidos de acordo com a formulação descrita por TERRA (1998), utilizando como ingredientes: carne bovina, gordura suína, farinha de rosca, água e sal. Os ingredientes foram adquiridos em mercado local (Salvador – BA), e transportados em caixas isotérmicas para o Laboratório de Inspeção e Tecnologia de Carnes e Derivados (LABCARNE) da Universidade Federal da Bahia. Imediatamente após chegada no LABCARNE, a carne bovina e gordura suína, foram processadas em moedor de carne (placa de corte de 8 mm de diâmetro) (MCR08 3.0, Arbel, São José do Rio Preto, Brasil), em seguida foram pesadas, assim como todos os demais ingredientes, para a elaboração das distintas formulações.

As diferentes formulações de hambúrgueres foram elaboradas, mantendo a mesma composição base, variando nos tratamentos com adição de probióticos em relação a cepa incorporada, bem como, a estratégia de incorporação das mesmas no produto (Figura 4). Para

efeito de comparação, também foi produzida uma formulação controle, ou seja, sem a adição de microrganismos probióticos (Tabela 4).

Figura 4 – Incorporação dos microrganismos probióticos na massa cárnea. A = Incorporação de *L. plantarum* na forma livre. B = Incorporação de cápsulas de *L. plantarum*. C = Incorporação de *L. rhamnosus* na forma livre. D = Incorporação de cápsulas de *L. rhamnosus*. E = Aspecto das cápsulas de *L. plantarum* na superfície da massa cárnea imediatamente antes da incorporação. F = Demonstração do aspecto da massa cárnea com as cápsulas de *L. plantarum* incorporadas



Fonte: Acervo pessoal.

Dessa forma, foram elaborados cinco tratamentos distintos, a saber:

- 1) C – tratamento controle, sem adição de cepas probióticas;
- 2) FLP – incorporação de *L. plantarum* ATCC 10012 como células livres em nível de 1,0% em substituição à água;
- 3) ELP – incorporação de *L. plantarum* ATCC 10012 em cápsulas em nível de 1,0% em substituição à água;

4) FLR – incorporação de *L. rhamnosus* ATCC 7469 como células livres em nível de 1,0% em substituição à água; e

5) ELR – incorporação de *L. rhamnosus* ATCC 7469 em cápsulas em nível de 1,0% em substituição à água.

Tabela 4 – Formulação dos hambúrgues com incorporação de *L. plantarum* e *L. rhamnosus*

Formulações	Carne bovina (%)	Gordura suína (%)	Farinha de rosca (%)	Água (%)	Sal (%)	Cepa (%)
C	71,68	17,92	4,48	4,48	1,43	Sem adição
FLP	71,68	17,92	4,48	3,48	1,43	1,0
ELP	71,68	17,92	4,48	3,48	1,43	1,0
FLR	71,68	17,92	4,48	3,48	1,43	1,0
ELR	71,68	17,92	4,48	3,48	1,43	1,0

C= Tratamento Controle; FLP= *L. plantarum* como célula livre; ELP = *L. plantarum* em cápsulas; FLR= *L. rhamnosus* como célula livre; ELR = *L. rhamnosus* em cápsulas.

Após pesagem de todos os ingredientes de cada formulação, as porções de massas cárneas dos 5 tratamentos foram misturadas (7 minutos) à mão, de forma individual e de acordo com as boas práticas de fabricação, até obtenção de uma massa homogênea. Em seguida, porções de 80 g foram moldadas em forma de hambúrguer (10 cm de diâmetro e 1 cm de espessura), embaladas sob condições aeróbias em sacos de cloreto de polivinila e armazenadas por 10 dias sob refrigeração (4 °C).

5.7. ANÁLISES

Os produtos cárneos elaborados foram analisados do ponto de vista físico-químico e microbiológico, no dia 0, e aos 3, 7 e 10 dias após processamento e armazenamento sob refrigeração. As análises de caracterização das cápsulas e de caracterização do produto cárneo produzido, foram realizadas nos dias 0 e/ou 10 de refrigeração. Todas as análises foram realizadas em triplicata, com duas repetições experimentais.

5.7.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

A determinação da cor da carne de hambúrguer crua, foi feita em um colorímetro Minolta (Chroma meter CR410, Konica Minolta Inc., Tokyo, Japan), utilizando iluminante D65, abertura de 2,54 cm de diâmetro e observador padrão de 10°. Após exposição da amostra à atmosfera por 30 minutos, para oxigenação da mioglobina, as mensurações relativas à cor foram realizadas, através da avaliação dos parâmetros L* que se refere à medida de luminosidade, a* ao índice de vermelho e b* ao índice de amarelo (MILTENBURGET et al., 1992).

O pH foi determinado utilizando um medidor de pH (Mpa-210, Tecnoyon, São Paulo, Brasil) em 10 g de amostras homogeneizadas em 90 mL de água destilada. De cada amostra foram pesadas 3 porções de 10g e em cada porção foram realizadas medições com 3 repetições, totalizando 9 verificações de pH por tratamento.

A análise instrumental do perfil de textura (AIPT) do hambúrguer foi realizada através do equipamento TA-TX Express Texture Analyzer (Stable Micro Systems®, Godalming, Reino Unido) com probe modelo SMS P/0-5R. Três hambúrgueres de carne bovina por tratamento foram assados em *grill* elétrico (George Foreman GBZ31SB, Salton, Inc., Mount Prospect, Illinois, USA.) por 5 minutos a 80 °C e então comprimidos por uma placa cilíndrica de 5 kg para realizar o teste de AIPT, que consiste em dois ciclos de compressão com 3 segundos de atraso entre os ciclos e 1,6 mm/s de velocidade da cruzeta. Foram estimados os parâmetros de dureza, elasticidade, mastigabilidade e coesividade.

A oxidação lipídica foi avaliada por alterações nas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como o malonaldeído (MDA), de acordo com o método descrito por Triki et al. (2013) com pequenas modificações. Para esta análise, 5 g de hambúrguer de cada tratamento foram homogeneizados em 35 mL de ácido tricloroacético a 7,5% (Êxodo Científica, São Paulo, Brasil) por 30 segundos em um misturador Ultra-Turrax de alta velocidade (Ika-Werke, GmbH & Co, Staufen, Alemanha). A solução foi filtrada (papel filtro Whatman n° 1) e 5 mL do filtrado foram misturados com 5 mL de uma solução de ácido tiobarbitúrico 0,02M, sendo a solução final mantida em ambiente escuro por 24 h a $20 \pm 1,5$ °C. A cor rosa formada foi determinada espectrofotometricamente (espectrofotômetro Lambda 15 UV / VIS, Perkin-Elmer, EUA) a 532. Os resultados foram expressos em mg MDA kg⁻¹ de amostra.

5.7.2. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Um total de 10 g de cada tratamento foram pesados assepticamente e colocados em sacos plásticos estéreis contendo 90 mL de água peptonada tamponada (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, foram homogeneizadas por 10 minutos em *Stomacher*® (Logen Scientific, LS 1901, São Paulo, Brasil), e após homogeneização completa, diluições seriadas foram inoculadas em meios de cultura específicos conforme Compêndio de Métodos para Exames Microbiológicos de Alimentos da American Public Health Association – APHA (APHA, 2013) e Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água (SILVA et al., 2010).

Para a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos foi utilizado o Ágar Padrão para Contagem (PCA) (Acumedia, Lansing, U.S.A.) (37 °C por 48 h). O Ágar MRS (MERCK, Darmstadt, Alemanha) foi usado para a contagem total de bactérias ácido lácticas (37 °C durante 48 h). Para a enumeração seletiva de *L. plantarum* utilizou-se o ágar LPSM desenvolvido por Bujalance et al. (2006) (37 °C por 72 h). O meio LPSM é composto de (em g L⁻¹): D-sorbitol (20), ágar (15), peptona bacteriana (10), extrato bovino (10), extrato de levedura (5), acetato de sódio (5), fosfato de potássio (2), citrato de amônio (2), sulfato de magnésio (0,1), sulfato de manganês (0,05), púrpura de bromocresol (0,02) e ciprofloxacina (0,0004). A contagem seletiva de *L. rhamnosus* foi feita em ágar MRS suplementado com

vancomicina, na concentração final de 1 mg L⁻¹, conforme descrito por Tharmaraj e Shah (2003) (37 °C por 72 h).

Para a enumeração de coliformes totais e termotolerantes e contagem de *Escherichia coli* utilizou-se caldo Verde Brilhante bile a 2% (ACUMEDIA, Lansing, USA), caldo EC (ACUMEDIA, Lansing, USA) (37 °C e 44,5 °C por 24 a 48 h, respectivamente) e ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (MERCK, Darmstadt, Alemanha). A pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada em ágar Baird Parker (DIFCO, Detroit, USA) enriquecido com emulsão de gema de ovo e telurito de potássio (37 °C por 48 h). Para a detecção de *Salmonella* spp. 25 g de cada amostra foram homogeneizados em 225 mL de água peptonada tamponada (ACUMEDIA, Lansing, USA) (37 °C por 18 h). O enriquecimento seletivo foi realizado em caldos Tetracionato (ACUMEDIA, Lansing, U.S.A) suplementado com solução de iodo, e Rappaport Vassiliadis (ACUMEDIA, Lansing, U.S.A) (37 °C por 24 h e 41,5 °C por 24 h, respectivamente). Finalizada a incubação, realizou-se plaqueamento seletivo diferencial em ágar Salmonella-Shigella (SS) (MERCK, Darmstadt, Alemanha), Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD) (MERCK, Darmstadt, Alemanha) e Hektoen Enteric (HE) (MERCK, Darmstadt, Alemanha) (37 °C por 24 h). As colônias sugestivas foram encaminhadas para realização das provas bioquímicas de identificação.

Todas as contagens de microrganismos foram convertidas em logaritmos de unidades formadoras de colônias por grama (log UFC g⁻¹).

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada no software SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey foram utilizados para determinar diferenças significativas (P < 0,05).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CÁPSULAS

6.1.1. TAMANHO E RENDIMENTO DO ENCAPSULAMENTO (RE %)

Os tamanhos das cápsulas foram de 3,53 e 3,34 mm para aquelas contendo *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, respectivamente (Tabela 5). Esses resultados corroboram com os observados na literatura para cápsulas produzidas a partir da técnica de extrusão, onde-se autores relatam diâmetros de cápsulas que variam entre 2 a 6 mm (KRASAEKOOPT, BHANDARI E DEETH, 2003; GÓMEZ-MASCARAQUE et al., 2018). Do mesmo modo, Cavalheiro et al. (2019b), relataram resultados similares para cápsulas de alginato contendo *L. plantarum* e *E. faecium* desenvolvidas pela mesma técnica, obtendo esferas com diâmetro médio de 3,8 e 3,4 mm, respectivamente. Por outro lado, as cápsulas de alginato produzidas por Abbaszadeh et al. (2014) e Krasaekoopt & Watcharapoka (2014), através da mesma metodologia, foram menores, variando entre 1,38 a 1,64 e 1,83 a 1,92 mm, respectivamente.

Tabela 5 - Diâmetro médio e rendimento de encapsulação das partículas de alginato, leite em pó, goma xantana e farinha de banana verde produzidas por extrusão.

Tratamento	Diâmetro médio (mm)	Antes da encapsulação (log UFC mL ⁻¹)	Depois da encapsulação (log UFC mL ⁻¹)	RE (%)
ELP	3,53 ± 0,19 ^A	13,39 ± 0,19 ^B	11,53 ± 0,06 ^B	86,17 ± 1,69 ^A
ELR	3,34 ± 0,04 ^B	14,73 ± 0,03 ^A	12,36 ± 0,07 ^A	83,88 ± 0,67 ^A

Notas: Dados apresentados como média ± desvio padrão; Letras diferentes na mesma coluna indicam que as médias diferem significativamente ($P < 0,05$); ELP = Cápsulas contendo *L. plantarum*; ELR = Cápsulas contendo *L. rhamnosus*.

As variações no tamanho das cápsulas produzidas através da técnica de extrusão, relatadas na literatura, estão diretamente relacionadas aos materiais utilizados na composição da parede da cápsula, diâmetro do bico utilizado para o gotejamento, distância entre o bico e a

solução de cloreto de cálcio, dentre outros fatores (KRASAEKOOPT, BHANDARI E DEETH, 2003; RATHORE et al., 2013). Além disso, o tamanho vai depender ainda de adaptações feitas na técnica. Etchepare et al. (2016a), por exemplo, desenvolveram um sistema de pressão de ar para realizar o encapsulamento de *L. acidophilus* por extrusão, utilizando alginato como principal componente de parede. A associação de um aerógrafo acoplado a um compressor de ar possibilitou o desenvolvimento de cápsulas significativamente menores, com diâmetros que variaram de 55,13 a 222 μm (ETCHEPARE et al., 2016a; 2016b; 2020).

Segundo Cavalheiro et al. (2019b), o tamanho das partículas tem uma influência importante na viabilidade dos probióticos e no efeito sensorial nos alimentos. Quanto maior a partícula, melhor a proteção conferida, por outro lado, cápsulas muito grandes podem interferir negativamente nos parâmetros sensoriais do produto, uma vez que podem ser perceptíveis ao consumidor. No entanto, apesar dessa premissa, Muthukumarasamy & Holley (2006), verificaram que as cápsulas de alginato obtidas em seu estudo e que apresentavam 2-3 mm de diâmetro, não afetaram os aspectos sensoriais dos embutidos cárneos fermentados elaborados. Os autores afirmaram que a semelhança das esferas, em tamanho e cor, com as partículas de gordura presentes no produto, fez com que as mesmas fossem imperceptíveis ao consumidor. O que demonstra que mesmo as macrocápsulas apresentam potencial para a incorporação em alimentos.

No presente trabalho, a contagem de células viáveis após o encapsulamento foi de 11,53 e 12,36 log UFC mL⁻¹ para *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, respectivamente. O que demonstra que o procedimento de imobilização das células probióticas utilizando alginato, leite em pó, farinha de banana verde e goma xantana resultou em um alto rendimento de encapsulação, obtendo-se valores de 86,17 e 83,88 % para os tratamentos ELP e ELR, respectivamente, conforme Tabela 5. Estes resultados evidenciam que os materiais utilizados na formulação da cápsula em associação com o alginato de sódio não interferiram na viabilidade dos microrganismos durante o processo de encapsulação. A elevada eficiência de encapsulação observada é reflexo das condições amenas do encapsulamento, realizado em temperatura ambiente e sem a utilização de solventes químicos. A principal vantagem da técnica de extrusão é não promover injúrias às células probióticas, o que geralmente resulta numa alta eficiência de encapsulação, apresentando taxas de sobrevivência dos microrganismos probióticos de até 95% (KRASAEKOOPT, BHANDARI E DEETH, 2003).

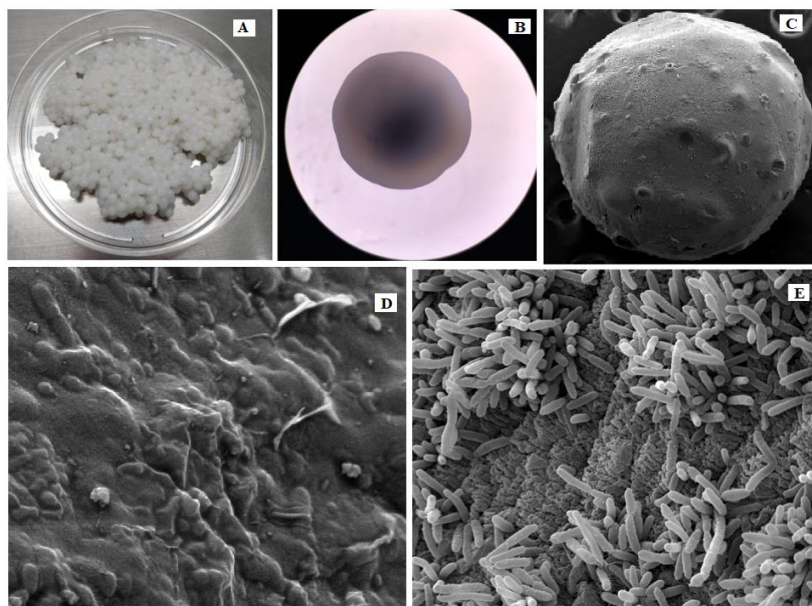
Estudos recentes, utilizando a técnica de extrusão, relataram resultados semelhantes. Hugues-Ayala et al. (2020) realizaram a imobilização de *L. rhamnosus* em microesferas de

alginato, observando RE maior que 85%. Cavalheiro et al. (2019b) obtiveram RE de 80,3 e 94,0% para as cápsulas de *E. faecium* e *L. plantarum*, respectivamente, enquanto o RE de *L. acidophilus* relatado por Etchepare et al. (2020) variou de 82,98 a 91,85% entre os tratamentos testados pelos autores.

6.1.2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÁPSULAS POR MICROSCOPIA

No presente estudo, a morfologia das cápsulas indicou forma esférica, coloração branca, superfície lisa, brilhante (Figura 5 A), uniforme e de bordas regulares (Figura 5 B e C).

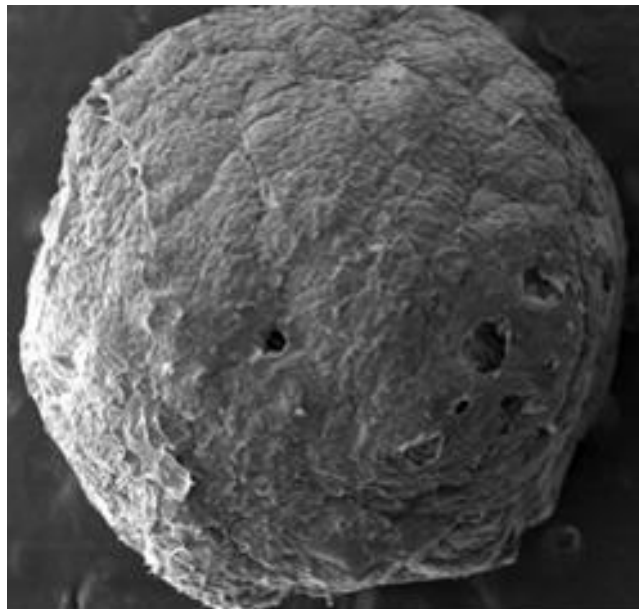
Figura 5 – Aspectos morfológicos da cápsula com matriz de alginato, leite em pó, farinha de banana verde e goma xantana. A = Aspecto macroscópico das cápsulas contendo microrganismos em seu interior. B = Superfície da cápsula por microscopia óptica (10x). C = Superfície da cápsula por microscopia eletrônica de varredura (60x). D = Superfície da partícula mostrando microrganismos encapsulados (2300x). E = *L. plantarum* no interior da cápsula (5000x).



Fonte: Acervo pessoal.

Como pode ser visto na Figura 5 (D e E), foi possível ainda verificar a presença dos materiais de cápsulas e microrganismos na superfície e em todo o interior da partícula. O aspecto da superfície por microscopia eletrônica de varredura (Figura 5 D) demonstrou irregularidades, bem como, presença de fragmentos dos componentes de parede. Esse resultado se deve ao processo de liofilização que a partícula foi submetida, o que resultou na desidratação das estruturas (Figura 6).

Figura 6 – Superfície da cápsula após liofilização. Aspecto morfológico da cápsula de *L. plantarum* após processo de liofilização por microscopia eletrônica de varredura (35x).



Fonte: Acervo pessoal.

Etchepare et al. (2016a, 2016b, 2020) relataram que o processo de liofilização causou encolhimento das cápsulas, formas irregulares, e presença de fragmentos na superfície das microcápsulas, estando de acordo com os achados no presente estudo. Segundo Dolly et al. (2011) esse fenômeno ocorre porque no processo de liofilização, as cápsulas são submetidas a baixas temperaturas, levando à formação de cristais de gelo e sublimação de cristais de gelo sob pressão reduzida, o que pode resultar em danos na estrutura das cápsulas.

6.1.3. AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA ÀS CONDIÇÕES SIMULADAS DO TRATO GASTROINTESTINAL

A viabilidade das células de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* livres e encapsuladas após simulação das condições do trato gastrointestinal (TGI), são descritas na Tabela 6. A cultura livre de *L. plantarum* (FLP), no início da digestão, apresentou contagem de 13,39 log UFC mL⁻¹, demonstrando redução ($P < 0,05$) de 7,79 log UFC mL⁻¹ após exposição ao suco gástrico simulado (pH 2,0 por 90 minutos), mantendo a viabilidade na fase entérica I (pH 5,0 por mais 20 minutos), e em seguida, apresentando nova redução significativa na fase entérica II (pH 7,5 por 90 minutos). Após 200 minutos de análise, o tratamento FLP resultou numa redução total maior que 9 log UFC mL⁻¹, finalizando o teste com uma contagem celular de 3,79 log UFC mL⁻¹. As cápsulas contendo *L. plantarum* (ELP), no entanto, apresentaram queda de apenas 3,06 log UFC g⁻¹, iniciando a análise com 11,53 log UFC g⁻¹, e mantendo contagens acima de 8 log UFC g⁻¹ no final da digestão simulada. Frente às mesmas condições, o tratamento contendo *L. rhamnosus* livre (FLR), iniciou a simulação ao TGI apresentando contagem de 14,73 log UFC mL⁻¹ que, ao final do processo, reduziu ($P < 0,05$) para 4,18 log UFC mL⁻¹. Por outro lado, quando encapsulado (ELR), o microrganismo manteve-se viável em quantidades adequadas durante todo o processo, apresentando a menor redução ($P < 0,05$) dentre todos os tratamentos, de 12,36 para 9,86 log UFC g⁻¹.

Enquanto as contagens das células livres diminuíram significativamente representando perda da viabilidade celular maior que 71% em FLP e FLR, a encapsulação em ambos os tratamentos conferiu maior viabilidade aos microrganismos expostos às condições simuladas do TGI. E embora a formulação das cápsulas tenha sido a mesma, diferenças significativas foram observadas nos resultados de ELP e ELR, obtendo-se contagens finais superiores a 8 e 9 log UFC g⁻¹, respectivamente. Ainda, de acordo com a Tabela 6, observa-se que ao final do processo de simulação do TGI *in vitro* (200 min), o tratamento ELR apresentou redução total na viabilidade de 20,22% enquanto o ELP uma redução de 26,54%, demonstrando que a cepa de *L. rhamnosus* foi mais resistente às condições do TGI, em relação a cepa de *L. plantarum*.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com os observados por Etchepare et al. (2020), que avaliaram a sobrevivência de uma cepa de *L. acidophilus*, na forma livre e encapsulada, exposta às condições simuladas do TGI. Os autores verificaram que todos os tipos de micropartículas avaliadas foram capazes de aumentar a sobrevivência do microrganismo ao processo de digestão, apresentando perdas na viabilidade celular que

variaram entre 22 a 26%, enquanto a redução do número de células livres foi superior a 61%. Da mesma forma, Pourjafar et al. (2020) observaram que a taxa de redução celular das formas encapsuladas de *L. rhamnosus* foi de 25%, enquanto o das culturas livres reduziram 57,14%. Estes resultados reforçam o efeito positivo que o encapsulamento exerce na proteção das bactérias probióticas, garantindo melhor viabilidade celular frente às características do TGI *in vitro*.

Tabela 6 – Viabilidade de *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, livres e encapsulados, expostos a condições gastrointestinais simuladas, em 0, 90, 110 e 200 minutos.

Tempo (min)	Tratamentos			
	FLP (log UFC mL ⁻¹)	ELP (log UFC g ⁻¹)	FLR (log UFC mL ⁻¹)	ELR (log UFC g ⁻¹)
0	13,39 ± 0,19 ^{b,A}	11,53 ± 0,06 ^{d,A}	14,73 ± 0,03 ^{a,A}	12,36 ± 0,07 ^{c,A}
90	5,60 ± 0,28 ^{d,B}	9,45 ± 0,44 ^{b,B}	7,63 ± 0,23 ^{c,B}	11,34 ± 0,32 ^{a,B}
110	5,33 ± 0,29 ^{d,B}	9,35 ± 0,15 ^{b,B}	6,48 ± 0,39 ^{c,C}	10,85 ± 0,11 ^{a,B}
200	3,79 ± 0,24 ^{c,C}	8,47 ± 0,13 ^{b,C}	4,18 ± 0,15 ^{c,D}	9,86 ± 0,15 ^{a,C}
Redução (%)	71,69	26,54	71,62	20,22

Médias ± desvio padrão; Letras diferentes nas colunas (A,B,C,D) e nas linhas (a,b,c,d) são significativamente diferentes (P < 0,05); FLP = Células livres de *L. plantarum*; ELP = Cápsulas contendo *L. plantarum*; FLR = *L. Células livres de rhamnosus* ELR = Cápsulas contendo *L. rhamnosus*.

É consenso que a imobilização de células microbianas com alginato, por si só, promove o isolamento físico do ambiente externo, mantendo um microambiente interno favorável à manutenção da viabilidade celular. Entretanto sabe-se que os ingredientes utilizados em associação ao biopolímero são responsáveis pela maior estabilidade das cápsulas frente às condições ambientais adversas (ETCHEPARE et al., 2016b; CHEN et al., 2017; ETCHEPARE et al., 2020).

Os resultados obtidos demonstram, portanto, que os materiais de parede utilizados nesse estudo em complemento ao alginato de sódio (farinha de banana verde e goma xantana), foram eficientes na redução da porosidade das cápsulas, e conseqüentemente, na proteção dos probióticos encapsulados. De modo similar, autores relataram que a adição de amido resistente, quitosana e goma xantana na formulação de cápsulas, aumentou a sobrevivência

das bactérias no sistema digestivo simulado, resultando em um maior número de células viáveis nas partículas contendo estes ingredientes na composição (ETCHEPARE et al., 2016a, CHEN et al., 2017; POURJAFAR et al., 2020).

6.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DE HAMBÚRGUER COM ADIÇÃO DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

6.2.1. PARÂMETROS DE COR

A cor da carne é um importante parâmetro para os consumidores, uma vez que é a principal característica utilizada para determinar a aceitabilidade dos produtos cárneos (CAVALHEIRO et al., 2020). No presente estudo, os parâmetros de cor foram significativamente afetados pelos tratamentos e tempo de armazenamento (Tabela 7).

A exceção do controle, os resultados obtidos para L*, a* e b* apresentaram-se na faixa citada por Muchenje et al. (2009) de 32,20 – 41,00, 11,10 – 23,60 e 6,10 – 11,30, respectivamente. No início do período de armazenamento dos hambúrgueres (Dia 0), os valores de L* variaram entre 44,00 e 45,22. Ao longo do período de armazenamento, foi possível observar aumento nos valores de L* para os tratamentos ELP, FLR e ELR, sendo os maiores índices observados ao fim dos 10 dias sob refrigeração. No entanto, não foi observada diferença significativa entre os valores para os tratamentos C e FLP, no início e ao final do armazenamento. Os valores de luminosidade (L*) encontrados neste trabalho estão de acordo com os relatados por Trabelsi et al (2019) em carne moída com adição de *L. plantarum*.

A descoloração de produtos cárneos evidenciada pelo aumento dos valores de L* é considerada um fenômeno natural de deterioração durante o armazenamento, e pode ser resultado da oxidação lipídica (FALOWO, FAYEMI E MUCHENJE, 2014).

Tabela 7 – Parâmetros instrumentais de cor (luminosidade, L*; teor de vermelho, a*; teor de amarelo, b*) da carne de hambúrguer com adição de *L.plantarum* e *L. rhamnosus* durante o armazenamento a 4 ° C.

Parâmetro	Tratamentos	Dias de armazenamento			
		0	3	7	10
L*	C	44,83 ± 0,25 ^{a,AB}	42,03 ± 0,16 ^{b,cC}	40,57 ± 0,97 ^{c,B}	42,95 ± 1,14 ^{ab,B}
	FLP	45,22 ± 0,50 ^{a,A}	45,08 ± 0,22 ^{a,AB}	45,78 ± 0,16 ^{a,A}	45,21 ± 0,45 ^{a,AB}
	ELP	44,00 ± 0,47 ^{b,B}	45,39 ± 0,34 ^{a,bA}	45,92 ± 0,05 ^{a,bA}	46,48 ± 1,56 ^{a,A}
	FLR	44,61 ± 0,28 ^{c,AB}	44,78 ± 0,65 ^{c,AB}	45,79 ± 0,16 ^{b,A}	47,08 ± 0,32 ^{a,A}
	ELR	44,36 ± 0,27 ^{c,AB}	45,15 ± 0,17 ^{bc,AB}	46,28 ± 0,79 ^{ab,A}	47,53 ± 1,02 ^{a,A}
a*	C	19,35 ± 0,05 ^{a,C}	7,77 ± 0,21 ^{b,C}	4,66 ± 0,08 ^{c,C}	4,56 ± 0,21 ^{c,C}
	FLP	21,90 ± 0,34 ^{a,AB}	20,04 ± 1,62 ^{a,AB}	17,20 ± 0,30 ^{b,B}	14,99 ± 0,89 ^{b,B}
	ELP	22,11 ± 0,65 ^{a,A}	19,45 ± 0,48 ^{b,B}	17,10 ± 0,09 ^{c,B}	16,15 ± 0,60 ^{c,B}
	FLR	20,46 ± 0,55 ^{a,C}	20,71 ± 0,14 ^{a,AB}	17,52 ± 0,21 ^{b,B}	16,10 ± 0,24 ^{c,B}
	ELR	20,52 ± 0,52 ^{a,BC}	21,72 ± 0,56 ^{a,A}	18,31 ± 0,16 ^{b,A}	18,20 ± 0,48 ^{b,A}
b*	C	8,62 ± 0,20 ^{a,B}	5,75 ± 0,16 ^{c,B}	7,50 ± 0,24 ^{b,A}	7,18 ± 0,35 ^{b,B}
	FLP	9,57 ± 0,28 ^{a,A}	8,50 ± 0,90 ^{a,A}	6,27 ± 0,34 ^{b,B}	8,43 ± 0,11 ^{a,A}
	ELP	9,78 ± 0,28 ^{a,A}	8,57 ± 0,17 ^{a,A}	6,32 ± 0,14 ^{b,B}	8,93 ± 0,37 ^{a,A}
	FLR	10,03 ± 0,11 ^{a,A}	9,00 ± 0,33 ^{b,A}	6,40 ± 0,32 ^{c,B}	8,56 ± 0,50 ^{b,A}
	ELR	9,49 ± 0,08 ^{ab,A}	9,58 ± 0,38 ^{a,A}	6,46 ± 0,43 ^{c,B}	8,64 ± 0,38 ^{b,A}

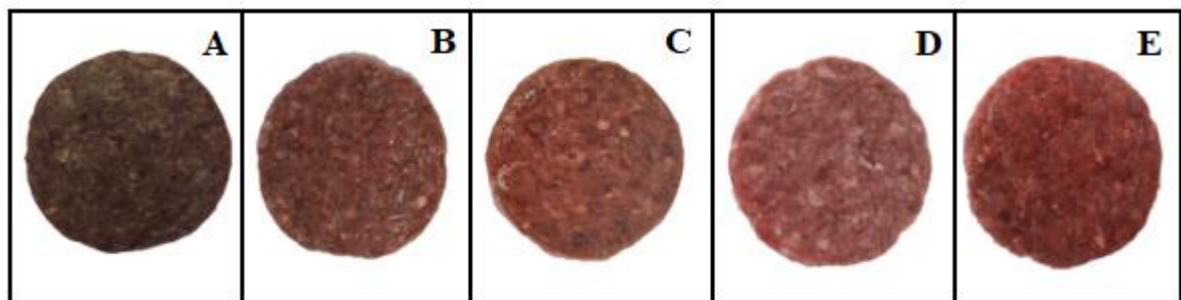
Médias ± desvio padrão. Letras diferentes nas colunas (A,B,C,D) e nas linhas (a,b,c) são significativamente diferentes (ANOVA P < 0,05). C= Controle sem adição de probióticos; FLP= Adição de células livres *L. plantarum*; ELP= Adição *L. plantarum* em cápsulas; FLR= Adição de células livres de *L. rhamnosus*; ELR= Adição de *L. rhamnosus* em cápsulas.

Bem Slima et al., (2018) também relataram aumento (P < 0,05) na luminosidade de linguiças frescas com adição de *L. plantarum* armazenadas sob refrigeração e atribuíram o fato à coagulação de proteínas, que pode levar a liberação de água para a superfície, aumentando assim a dispersão da luz no produto.

No geral, o teor de a^* diminuiu ao longo do período de armazenamento, apresentando reduções significativas a partir do 7º dia de armazenamento em todos os tratamentos. A perda de vermelho, está relacionada com a degradação oxidativa da mioglobina. A conversão deste pigmento em metamioglobina resulta no escurecimento indesejável da carne (DOMÍNGUEZ et al., 2019). No entanto, a diminuição nos valores de a^* pode estar relacionada com os resultados obtidos na análise de oxidação lipídica (Tabela 10), uma vez que a oxidação dos lipídios na carne potencializa os efeitos da oxidação da mioglobina (CHAIJAN, 2008).

Embora a alteração da cor vermelha (Figura 7) dos hambúrgueres tenha sido notada em todos os tratamentos, a maior perda de vermelho foi observada no controle (Figura 7 A), cuja redução ($P < 0,05$) foi superior a 76% (19,35 para 4,56) ao final do armazenamento. Por outro lado, FLP, ELP, FLR e ELR mantiveram intensidades de vermelho significativamente maiores ($P < 0,05$), em relação ao controle, com valores de 14,99; 16,15; 16,10 e 18,20, respectivamente. De modo similar, no final do armazenamento, Trabelsi et al. (2019) observaram que o teor de vermelho da carne moída tratada com *L. plantarum* foi significativamente maior do que no tratamento sem adição do probiótico. O que demonstra que existe uma relação entre a adição de probióticos e uma menor perda de vermelho, em produtos cárneos, durante a estocagem.

Figura 7 – Aspecto visual de hambúrgueres com incorporação dos microrganismos probióticos após 10 dias de armazenamento. A = Tratamento controle (C). B = Incorporação de *L. plantarum* na forma livre (FLP). C = Incorporação de cápsulas de *L. plantarum* (ELP). D = Incorporação de *L. rhamnosus* na forma livre (FLR). E = Incorporação de cápsulas de *L. rhamnosus* (ELR).



Fonte: Acervo pessoal.

Estes resultados demonstram que a adição de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* foi efetiva na supressão da oxidação do grupo heme da molécula de ferro, diminuindo a degradação da mioglobina e, conseqüentemente, retardando a perda de vermelho nos hambúrgueres. Como no presente estudo não foram incluídos aditivos na formulação dos hambúrgueres, os resultados obtidos indicam possível efeito antioxidante das cepas incorporadas.

Atualmente, a propriedade antioxidante de diversas cepas LAB tem sido objeto de estudos, sobretudo como possíveis substitutos aos antioxidantes sintéticos utilizados, com vistas a melhoria da qualidade dos produtos cárneos (Smaoui et al., 2017). Entretanto ainda há escassez de pesquisas sobre os efeitos das atividades antioxidantes destes microrganismos em produtos cárneos, especialmente, frescos. Nedelcheva et al. (2010) verificaram que a cepa de *L. plantarum* utilizada na produção de embutido fermentado, apresentou atividade antioxidante contra radicais peróxidos e preservou a cor dos produtos cárneos. Em outros estudos, a atividade antioxidante de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* também foi verificada através da capacidade de eliminação de radicais, produção de enzimas e genes relacionados a antioxidantes (YANG et al., 2019; LIU et al., 2018).

Ainda, foram observadas diferenças significativas na preservação da cor vermelha entre as cepas empregadas, bem como entre as estratégias para a incorporação adotadas, obtendo menor ($P < 0,05$) perda de a^* nos produtos tratados com *L. rhamnosus*, sobretudo em ELR. Em relação aos hambúrgueres tratados com *L. plantarum*, o teor de vermelho foi significativamente maior em ELP. O que demonstra que a encapsulação foi positiva na preservação da coloração vermelha na carne de hambúrguer, atrasando a descoloração e ampliando a vida de prateleira do produto. Cavalheiro et al. (2020) verificaram diferenças ($P < 0,05$) no teor de vermelho de salames inoculados com *L. plantarum* por emulsão dupla, em comparação com os salames tratados com células livres, cápsulas obtidas por extrusão e por emulsão simples. Estes resultados demonstram que a preservação da cor vermelha pode ser influenciada pela estratégia de incorporação adotada.

A intensidade do teor de amarelo (b^*) diminuiu significativamente, em C e FLR, a partir do 3º dia, e em FLP, ELP e ELR após 7 dias de armazenamento do hambúrguer. Ao final do período estudado, observou-se aumento nos valores de amarelo em FLP, ELP, FLR e ELR, não havendo diferenças estatísticas entre os tratamentos cujas adições foram feitas na forma de células livres e nos tratamentos que receberam as cápsulas. Entretanto, houve diferença ($P < 0,05$) no resultado do teor de amarelo em relação a espécie do microrganismo adicionada. Enquanto foi observada a diminuição dos valores de b^* em FLR e ELR entre o início (dia 0) e o final (dia 10), não houve diferença significativa nos valores constatados de

b* para os tratamentos FLP e ELP, entre o mesmo período.

Estes resultados demonstram que a incorporação de *L. plantarum* não afetou a intensidade de amarelo nos hambúrgueres no presente estudo. Em contrapartida, ambos os tratamentos contendo *L. rhamnosus* apresentaram redução dos valores iniciais do teor de amarelo, no entanto, a diminuição se mostrou significativa apenas em FLR. Segundo Ruiz et al. (2014), a diminuição no teor de amarelo está relacionada ao consumo de oxigênio por microrganismos fermentativos, produzindo uma diminuição na oximioglobina, a qual contribui para a formação da cor amarela nos produtos cárneos.

Os resultados obtidos estão também de acordo com os relatados por Cavalheiro et al. (2019a), que observaram perda de amarelo em chouriços incorporados com *L. plantarum* independentemente da composição ou método de encapsulação. Segundo os autores, os valores de b* variaram de 25,12 e 27,86, no início do processamento, a 17,26 e 21,18 após 20 dias. Do mesmo modo que no presente trabalho, Trabelsi et al. (2019) e Ben Slima et al. (2018) verificaram que a adição de *L. plantarum* não afetou a intensidade de amarelo nos produtos cárneos elaborados e avaliados ao longo do período de estudo.

6.2.2 ANÁLISE DE PH

As alterações nos níveis de pH durante o armazenamento refrigerado por 10 dias dos hambúrgueres com adição de microrganismos probióticos livres e encapsulados são mostradas na Tabela 8.

Os valores iniciais de pH dos hambúrgueres no dia 0 situaram-se entre 5,57 e 5,66. Durante o armazenamento, o pH da amostra controle aumentou significativamente, iniciando com 5,64 e chegando ao fim da estocagem com pH 6,15. Por outro lado, após as primeiras 72h em refrigeração, foi observado declínio ($P < 0,05$) do pH, sobretudo nos tratamentos contendo os microrganismos, apresentando valores de 5,24; 5,34; 5,28 e 5,31 para FLP, ELP, FLR e ELR, respectivamente. No nosso estudo, o pH sofreu influência da espécie de lactobacilos incorporada, uma vez que as reduções observadas foram maiores ($P < 0,05$) nos hambúrgueres tratados com *L. rhamnosus*, e mantiveram-se estáveis durante todo o armazenamento. Entretanto, não houve diferença ($P < 0,05$) nos valores de pH obtidos entre os hambúrgueres adicionados de células probióticas livres e em cápsulas, o que demonstra que independente da estratégia de incorporação, os microrganismos foram capazes de reduzir

o pH do produto.

Esses resultados indicam que o metabolismo dos microrganismos probióticos foi mais intenso nos 3 primeiros dias de armazenamento, sendo a redução do pH uma provável consequência da produção de ácidos orgânicos por estas bactérias. Ben Slima et al. (2017), observaram redução significativa do pH de linguças frescas de carne, a partir do 5º dia de refrigeração, e atribuíram esse resultado à produção de ácido lático pela cepa de *L. plantarum* adicionada à formulação do embutido cárneo.

Tabela 8 – pH da carne de hambúrguer com adição de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* durante o armazenamento a 4 ° C.

Parâmetro	Tratamentos	Dias de armazenamento			
		0	3	7	10
pH	C	5,64 ± 0,02 ^{bc,AB}	5,54 ± 0,04 ^{c,A}	5,69 ± 0,02 ^{b,A}	6,15 ± 0,09 ^{a,A}
	FLP	5,65 ± 0,01 ^{a,A}	5,24 ± 0,04 ^{b,B}	5,59 ± 0,13 ^{a,A}	5,69 ± 0,18 ^{a,B}
	ELP	5,66 ± 0,04 ^{a,A}	5,34 ± 0,02 ^{b,B}	5,63 ± 0,10 ^{a,A}	5,61 ± 0,02 ^{a,BC}
	FLR	5,62 ± 0,01 ^{a,AB}	5,28 ± 0,04 ^{b,B}	5,35 ± 0,04 ^{b,B}	5,38 ± 0,02 ^{b,CD}
	ELR	5,57 ± 0,02 ^{a,B}	5,31 ± 0,03 ^{b,B}	5,32 ± 0,04 ^{b,B}	5,30 ± 0,01 ^{b,D}

Médias ± desvio padrão. Letras diferentes nas colunas (A,B,C,D) e nas linhas (a,b,c) são significativamente diferentes (ANOVA P < 0,05). C= Controle sem adição de probióticos; FLP= Adição de células livres *L. plantarum*; ELP= Adição de *L. plantarum* em cápsulas; FLR= Adição de células livre de *L. rhamnosus*; ELR= Adição de *L. rhamnosus* em cápsulas.

Os resultados obtidos demonstram ainda que a incorporação dos microrganismos surtiu efeito positivo na estabilidade do pH dos hambúrgueres, uma vez que os tratamentos com *L. plantarum* e *L. rhamnosus* resultaram em valores de pH significativamente menores do que os observados no controle. Os resultados do presente trabalho, estão de acordo com os obtidos por Ayyash et al. (2019) e Trabelsi et al. (2019) que verificaram menores (P < 0,05) valores de pH nas amostras de linguça fermentada e carne moída tratadas *L. plantarum*, em comparação com os produtos não inoculados. A redução de pH contribui para a inibição de bactérias patogênicas e, em produtos cárneos, promove melhorias na firmeza e sabor (BEN SLIMA et al., 2017), portanto, sendo um aspecto tecnológico desejável na elaboração de produtos cárneos.

6.2.3 ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA

O perfil de textura dos hambúrgueres com adição de microrganismos probióticos foi realizado após o processo de fabricação (dia 0) e os resultados estão dispostos na Tabela 9. Os valores para os parâmetros de dureza (10,34 - 19,91 N) e mastigabilidade (6,49 - 11,61 N x mm) foram menores ($P < 0,05$) nos tratamentos contendo adição de *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, em relação ao controle. A exceção de FLR não houve diferença ($P < 0,05$) no parâmetro elasticidade (0,86 – 0,92 mm) entre os tratamentos. No entanto, a coesividade (0,63 – 0,73) aumentou significativamente nos tratamentos contendo probióticos em relação a amostra controle.

No presente trabalho, não se observou relação entre a inclusão de cápsulas de alginato (ELP e ELR) e alterações nos parâmetros de textura. Esse resultado demonstra que a incorporação de cápsulas no hambúrguer não afetou negativamente o perfil de textura do produto.

Tabela 9 – Perfil de textura de hambúrgueres com adição de *L. plantarum* e *L. rhamnosus*.

Tratamentos	Dureza (N)	Elasticidade (mm)	Mastigabilidade (N x mm)	Coesividade
C	19,91 ± 0,19 ^A	0,91 ± 0,01 ^A	11,61 ± 0,54 ^A	0,63 ± 0,32 ^B
FLP	13,73 ± 0,35 ^B	0,90 ± 0,01 ^A	8,79 ± 0,22 ^B	0,70 ± 0,15 ^A
ELP	13,30 ± 0,15 ^B	0,91 ± 0,01 ^A	8,50 ± 0,45 ^B	0,69 ± 0,02 ^A
FLR	10,34 ± 0,40 ^D	0,86 ± 0,00 ^B	6,49 ± 0,23 ^C	0,73 ± 0,01 ^A
ELR	12,15 ± 0,47 ^C	0,92 ± 0,02 ^A	7,89 ± 0,11 ^B	0,70 ± 0,01 ^A

Médias ± desvio padrão. Letras diferentes nas colunas (A, B, C, D) são significativamente diferentes (ANOVA $P < 0,05$). C= Controle sem adição de probióticos; FLP= Adição de células livres *L. plantarum*; ELP= Adição de *L. plantarum* em cápsulas; FLR= Adição de células livres de *L. rhamnosus*; ELR= Adição de *L. rhamnosus* em cápsulas.

Dentre os fatores que interferem diretamente na dureza estão o teor de gordura e atividade proteolítica da microbiota presentes na carne (SANTOS et al., 2019; GALLI et al., 2019). Entretanto não houve diferenças entre o teor de gordura dos tratamentos, visto que foram preparados a partir da mesma massa homogênea, diferindo apenas na adição das bactérias probióticas. Sendo assim, o resultado obtido indica que a diminuição observada nos parâmetros de dureza em FLP, ELP, FLR e ELR seja reflexo do efeito das cepas incorporadas

na hidrólise proteica (GALLI et al., 2019). A redução do parâmetro mastigabilidade, por outro lado, surge como consequência dos valores obtidos para dureza, uma vez que estão diretamente relacionados entre si.

Ben Slima et al. (2017) verificaram que a adição de probiótico *L. plantarum* induziu uma diminuição significativa na dureza de linguças frescas de carne após 5 e 10 dias de armazenamento. Os autores afirmaram que a redução na dureza proporcionou produtos mais macios, tornando-os mais aceitáveis para os consumidores.

Em relação à coesividade, Bis-Souza et al. (2020) observaram aumento ($P < 0,05$) do parâmetro em embutido fermentado espanhol com adição de *L. rhamnosus* GG após 3 dias de maturação. Os autores atribuíram este efeito à fermentação e consequente diminuição de pH do produto cárneo, provocando a agregação de proteínas miofibrilares. De forma similar, no presente trabalho, os maiores valores de coesividade foram obtidos nos tratamentos com os menores valores de pH.

De acordo com Smaoui et al. (2014), os consumidores preferem produtos cárneos que não sejam duros, e que sejam mais coesos e fáceis de mastigar. No presente estudo, a dureza da carne de hambúrguer bem como a mastigabilidade foram reduzidas, enquanto a coesividade aumentou, significativamente, com a incorporação das cepas probióticas. Isso indica que a adição de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* na carne de hambúrguer melhorou os parâmetros de textura.

6.2.4 OXIDAÇÃO LIPÍDICA

A carne e os produtos à base de carne, especialmente crus, são suscetíveis a oxidação lipídica durante o processamento e armazenamento. A oxidação lipídica é uma das principais causas de deterioração da qualidade da carne, além de representar importante fator de limitação do prazo de validade dos produtos. A deterioração lipídica resulta em descoloração, desenvolvimento de odor rançoso, sabor desagradável, alteração da textura, formação de compostos tóxicos e perdas no valor nutritivo. Essas alterações ocorrem mais rapidamente em carnes trituradas, devido à maior área superficial que permite o contato direto entre lipídios e ar, acelerando a oxidação (VILLALOBOS-DELGADO et al., 2020; VILLALOBOS-DELGADO et al., 2019; SMAOUI et al., 2016; FALOWO, FAYEMI E MUCHENJE, 2014).

O método mais comum para determinação da oxidação lipídica em carnes e produtos

cárneos é a medição de Substâncias Reativas ao Ácido 2-Tiobarbitúrico (TBARS), substâncias estas, produzidas durante o processo oxidativo dos lipídios. O principal produto secundário da oxidação lipídica, reagente com o ácido 2-tiobarbitúrico é o malonaldeído (MDA) (RAHARJO & SOFOS, 1993). As alterações observadas no teste TBARS de hambúrgueres com incorporação de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* entre os dias 0 e 10 de armazenamento, são apresentados na Tabela 10, e expressos em mg de MDA kg⁻¹.

Tabela 10 – Oxidação lipídica (TBARS) de hambúrgueres com adição de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* no período de 10 dias de refrigeração.

Parâmetro	Tratamentos	Dias de armazenamento	
		0	10
TBARS	C	0,031 ± 0,008 ^{C,b}	0,683 ± 0,023 ^{A,a}
	FLP	0,101 ± 0,003 ^{A,b}	0,360 ± 0,173 ^{B,a}
	ELP	0,049 ± 0,020 ^{BC,b}	0,749 ± 0,086 ^{A,a}
	FLR	0,078 ± 0,009 ^{B,b}	0,377 ± 0,045 ^{B,a}
	ELR	0,080 ± 0,007 ^{B,b}	0,801 ± 0,048 ^{A,a}

Médias ± desvio padrão. Valores expressos em mg MDA kg⁻¹. Letras diferentes nas colunas (A, B, C) e nas linhas (a, b) são significativamente diferentes (ANOVA, P < 0,05). C= Controle sem adição de probióticos; FLP= Adição de células livres *L. plantarum*; ELP= Adição de *L. plantarum* em cápsulas; FLR= Adição de células livres de *L. rhamnosus*; ELR= Adição de *L. rhamnosus* em cápsulas.

Em geral, os tratamentos foram afetados pelo período de armazenamento, demonstrando aumento (P < 0,05) nos valores de TBARS entre os dias 0 e 10 de estocagem refrigerada. No primeiro dia de armazenamento, os valores de oxidação lipídica variaram de 0,031 a 0,101 mg MDA kg⁻¹, enquanto que 10 dias depois exibiram valores que variaram entre 0,360 a 0,801 mg MDA kg⁻¹. A forma de incorporação dos microrganismos, em células livres ou em cápsulas, influenciou significativamente nos índices de TBARS observados nos produtos. Por outro lado, não houve diferença (P < 0,05) entre as espécies incorporadas.

No final do armazenamento a 4 °C os hambúrgueres tratados com os microrganismos na forma livre (FLP e FLR), apresentaram valores de TBARS de 0,360 e 0,377 mg MDA kg⁻¹, respectivamente. Enquanto, para o tratamento C, o valor de TBARS aumentou de 0,031 para 0,683 mg MDA kg⁻¹, no mesmo período. Estes resultados demonstram que as cepas de *L.*

plantarum e *L. rhamnosus* incorporadas diretamente nos hambúrgueres, foram capazes de retardar a oxidação lipídica dos mesmos, resultando em níveis de oxidação significativamente menores do que nos hambúrgueres sem adição de probióticos. De modo similar, outros autores relataram atividades antioxidantes de *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, incluindo a inibição da peroxidação lipídica e eliminação de radicais livres no alimento, resultando em menores valores de TBARS (TRABELSI et al., 2019; YANG et al., 2019; LIU et al., 2018; SMAOUI et al., 2017).

Este achado pode estar relacionado ainda com a produção de substâncias antimicrobianas pelas cepas adicionadas, uma vez que as espécies são conhecidamente produtoras de ácido láctico e bacteriocinas. Smaoui et al. (2016) relataram que o tratamento com BacTN635, bacteriocina produzida por *L. plantarum* TN635, foi mais eficiente contra a proliferação da microbiota da carne moída bovina, levando a uma diminuição ($P < 0,05$) nos valores de TBARS e conseqüente melhoria da conservação da carne. Assim, estes resultados indicam que as cepas utilizadas no presente estudo podem possuir propriedades antioxidantes, bem como, serem produtoras de metabólitos antimicrobianos.

No entanto, em comparação com os tratamentos inoculados com células livres, ELP e ELR, apresentaram valores de TBARS significativamente maiores após 10 dias de armazenamento refrigerado. As amostras de hambúrgueres contendo adição de cápsulas de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* evidenciaram acréscimo ($P < 0,05$) de 0,700 e 0,721 mg MDA kg^{-1} nos níveis de oxidação lipídica, respectivamente, entre o começo e o fim do armazenamento. Entretanto, embora os valores de TBARS em ELP e ELR tenham aumentado no período de estocagem refrigerada, não diferiram significativamente do resultado obtido no tratamento controle.

Em outros produtos cárneos, a incorporação de microrganismos probióticos também foi eficiente em retardar a oxidação lipídica no decorrer da estocagem. Trabelsi et al. (2019) relataram que a carne moída bovina refrigerada sem adição de *L. plantarum* apresentou nível de oxidação de 2,26 mg MDA kg^{-1} após 14 dias de armazenamento, enquanto os tratamentos com o microrganismo resultaram em valores significativamente menores (1,50 a 1,83 mg MDA kg^{-1}). Em trabalho sobre a extensão da vida de prateleira de carne moída, Khalili Sadaghiani et al. (2019), verificaram que as amostras tratadas com *L. reuteri* e *L. plantarum* com associação com extrato de alho, apresentaram valor de TBARS de 1,66 e 1,51 mg MDA kg^{-1} ou 37,35 e 43,02% de redução, respectivamente, em comparação com o controle, após 12 dias em refrigeração. Em linguças frescas de carne bovina, 7 e 8 log UFC g^{-1} de *L. plantarum* TN8, para substituição parcial dos níveis de nitrito, foram suficientes para limitar a

peroxidação lipídica durante o armazenamento refrigerado, sustentando valores de TBARS de 0,67 mg MDA kg⁻¹, enquanto o tratamento controle apresentou níveis significativamente maiores (BEN SLIMA et al., 2017).

É importante ressaltar que embora dos valores de oxidação lipídica indiquem melhor qualidade dos hambúrgueres em FLP e FLR, os resultados obtidos na análise colorimétrica demonstram que todos os tratamentos com incorporação de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* exibiram efeitos na preservação da cor do produto. Uma vez que apesar dos níveis de TBARS observados em ELP e ELR não serem diferentes do obtido no tratamento controle, a preservação do teor de a* e de b* nestas amostras foi significativamente maior na análise de cor dos hambúrgueres (Tabela 7). Trabelsi et al. (2019) observaram que embora os valores de TBARS dos tratamentos contendo *L. plantarum* tenham aumentado no decorrer do armazenamento, em todos eles a perda de vermelho foi menor ($P < 0,05$) do que no controle, estando de acordo com os achados deste trabalho. Este achado pode estar relacionado com a presença de enzimas lipolíticas bacterianas que contribuem para a liberação de ácidos graxos livres, principal precursor de compostos voláteis que causam a oxidação de lipídios (BEN SLIMA et al., 2018; TRABELSI et al., 2019).

Segundo, Roghayeh et al. (2015), o limite para a percepção do ranço na carne bovina é 2,0 mg MDA kg⁻¹. Assim, de acordo com a Tabela 10, todos os resultados observados no presente estudo encontram-se abaixo do limiar de detecção de alterações sensoriais. Entretanto, a degradação química e formação de ranço na carne não são as únicas consequências indesejáveis da oxidação lipídica. O malonaldeído (MDA) formado durante o processo oxidativo dos lipídeos, tem sido apontado como um importante fator cancerígeno nos alimentos (FALOWO, FAYEMI E MUCHENJE, 2014; CHENG, 2016; VILLALOBOS-DELGADO et al., 2019). Portanto, a inibição da oxidação lipídica pela incorporação das células livres de *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, produz benefícios tecnológicos ao produto, bem como para a saúde do consumidor.

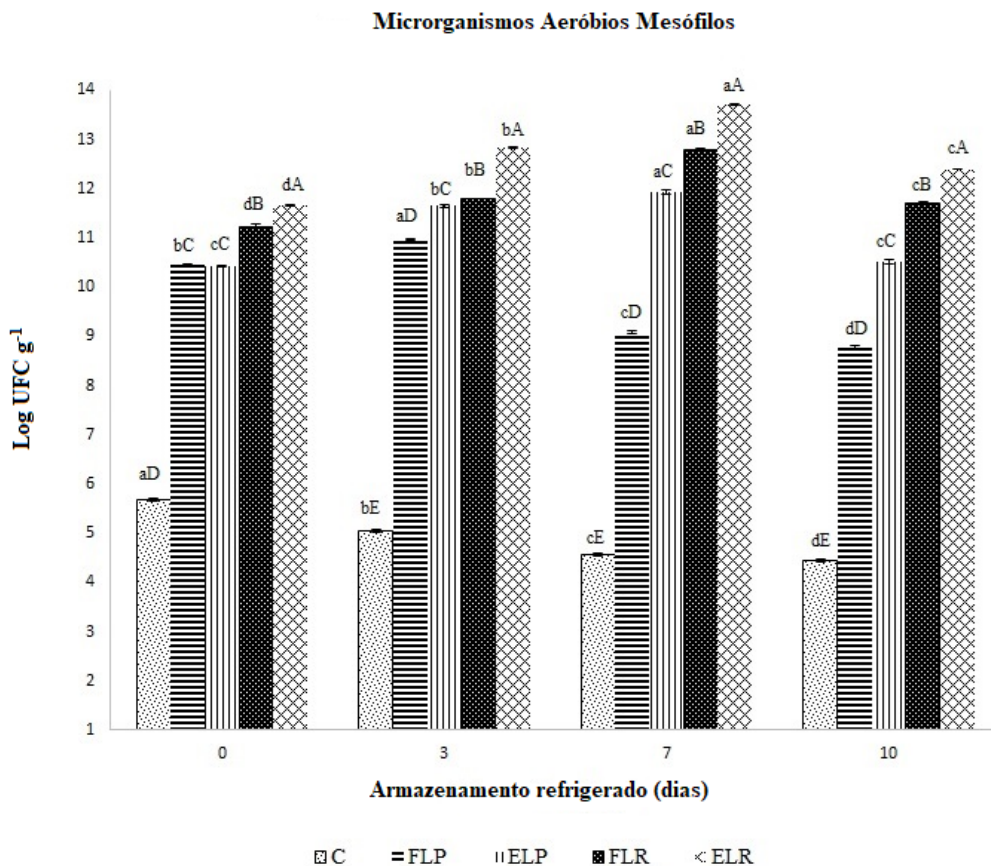
6.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE HAMBÚRGUER COM ADIÇÃO DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

Os parâmetros microbiológicos dos hambúrgueres analisados durante 10 dias de armazenamento sob refrigeração são mostrados nas Figuras 8 a 11.

6.3.1. CONTAGEM DE MICRORGANISMOS AERÓBIOS MESÓFILOS

As contagens microbianas totais foram afetadas pela adição de probióticos, apresentando nos tratamentos FLP, ELP, FLR e ELP, valores superiores ($P < 0,05$) aos observados na amostra controle, conforme Figura 8.

Figura 8 – Contagem de bactérias aeróbias mesófilas viáveis em hambúrgueres com adição de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* durante o armazenamento refrigerado.



Médias \pm desvio padrão. Letras minúsculas diferentes (a,b,c,d) são significativamente (ANOVA $P < 0,05$) diferentes entre os dias de armazenamento na mesma formulação. Letras maiúsculas diferentes (A,B,C,D,E) são significativamente (ANOVA $P < 0,05$) diferentes entre as formulações em um mesmo dia de armazenamento. C: Controle sem adição de probióticos; FLP= Adição de células livres *L. plantarum*; ELP= Adição de *L. plantarum* em cápsulas; FLR= Adição de células livres de *L. rhamnosus*; ELR= Adição de *L. rhamnosus* em cápsulas.

No dia 0, a população de mesófilos no tratamento controle foi de 5,67 log UFC g⁻¹, enquanto FLP, ELP, FLR e ELR exibiram contagens de 10,48; 10,43; 11,24 e 11,66 log UFC g⁻¹, respectivamente. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato dos microrganismos incorporados apresentarem caráter mesofílico, o que teria permitido o crescimento e a contabilização de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* a partir desta metodologia.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com os relatados por Cavalheiro et al. (2019a) e Pavli et al. (2020) cujos tratamentos sem adição de bactérias probióticas apresentaram valores significativamente mais baixos na contagem de células viáveis totais, em comparação aos tratamentos com adição de *L. plantarum*. Os autores afirmaram que esse resultado possivelmente é devido à maior disponibilidade do microrganismo quando incorporado como células livres ou em cápsulas de alginato.

No presente estudo, a partir do dia 3 de armazenamento, as diferenças se tornaram ainda mais expressivas entre os tratamentos com e sem adição de microrganismos, apresentando redução significativa das contagens no controle e aumento em todos os hambúrgueres tratados com probióticos. A estocagem refrigerada reduziu ($P < 0,05$) o crescimento dos microrganismos mesofílicos presentes nos hambúrgueres do tratamento controle, finalizando o estudo com 4,46 UFC g⁻¹. Em comparação com o dia 0, o tratamento FLP também apresentou diminuição ($P < 0,05$) nas contagens de aeróbios mesófilos, no entanto, manteve níveis superiores a 8 log UFC g⁻¹. Por outro lado, não foi observado o mesmo efeito da temperatura nos tratamentos ELP, FLR e ELR, uma vez que as contagens microbianas totais no final do armazenamento foram maiores ($P < 0,05$) às observadas inicialmente.

De modo similar, outros autores observaram que a presença da cápsula aumentou significativamente a taxa de sobrevivência dos microrganismos encapsulados durante a estocagem sob refrigeração. Nulkaekul et al. (2012), verificaram viabilidade de *L. plantarum* em cápsulas de alginato e quitosana por até 42 dias a 4 °C. As cápsulas de alginato e amido resistente formuladas por Mirzaei et al. (2012) possibilitaram a manutenção da viabilidade probiótica de *L. acidophilus* durante os 182 dias de estocagem refrigerada. Da mesma forma, Etchepare et al. (2016a) relataram que as cápsulas de *L. acidophilus* também compostas por alginato e amido resistente, conferiram melhor proteção celular do que as cápsulas de apenas de alginato, mantendo a viabilidade do microrganismo por até 105 dias a 7°C.

6.3.2. CONTAGEM DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

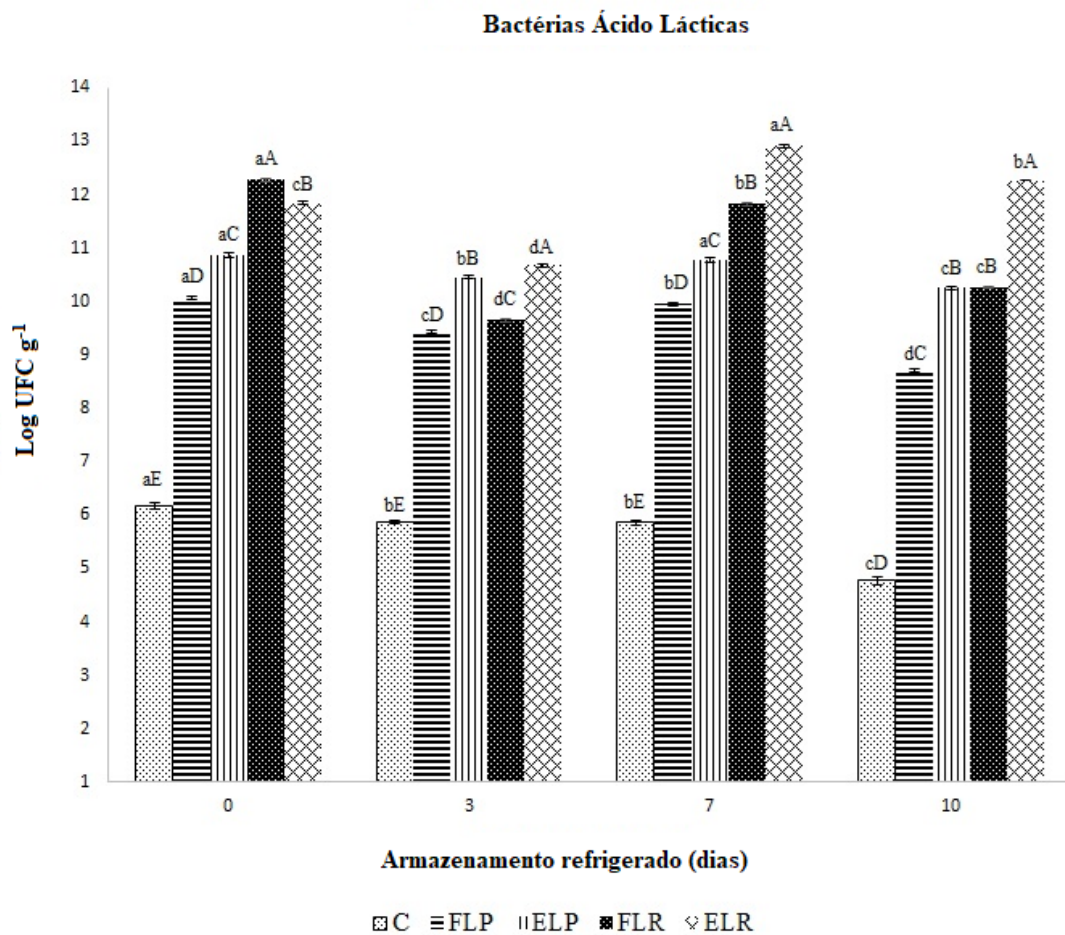
Os resultados das contagens de BAL nos hambúrgueres durante os 10 dias de armazenamento estão dispostos na Figura 9. Os valores obtidos demonstraram que as contagens de BAL nos tratamentos inoculados foram mais altas ($P < 0,05$) do que na formulação sem inoculação durante todo o estudo, o que reforça que os resultados verificados na contagem de microrganismos aeróbios mesófilos (Figura 8), foram influenciados pela adição de cepas probióticas nas formulações desenvolvidas. Bis-Souza et al. (2020) e Pavli et al. (2020) identificaram o mesmo padrão de relação entre as contagens de células viáveis totais e BAL, uma vez que as populações bacterianas foram sempre maiores nos tratamentos com adição do microrganismo probiótico, para ambas enumerações.

As diferenças ($P < 0,05$) nas populações de BAL entre FLP, ELP, FLR, ELR e o tratamento controle foram observadas a partir do início do armazenamento. Os tratamentos contendo *L. plantarum*, bem como aqueles com adição de *L. rhamnosus*, apresentaram contagens de BAL significativamente superiores ao controle em aproximadamente 4 e 6 log UFC g⁻¹, respectivamente. Isso demonstra que os microrganismos adicionados foram capazes de se adaptar à matriz cárnea, e aos demais ingredientes, permanecendo viáveis nos hambúrgueres. De modo similar, Ben Slima et al. (2018) relataram que as linguças frescas de carne inoculadas com culturas probióticas (*L. plantarum* e *Pediococcus acidilactici*) resultaram em contagens de BAL maiores ($P < 0,05$) que as amostras comerciais e controle, a partir do primeiro dia de estudo. Segundo os autores, esse resultado foi reflexo da boa adequação das cepas ao produto, o que indica que a carne e os demais ingredientes também não inibiram a viabilidade dos microrganismos incorporados.

No terceiro dia de armazenamento, observou-se redução ($P < 0,05$) na população de BAL em todos os tratamentos, no entanto, contagens superiores a 9 log UFC g⁻¹ foram observadas nos tratamentos com células livres e acima de 10 log UFC g⁻¹ nos hambúrgueres tratados com cápsulas probióticas. No entanto, no sétimo dia de armazenamento em condições de refrigeração, houve um aumento significativo das contagens em FLP, ELP, FLR e ELR, apresentando valores de 9,95; 10,77; 11,83 e 12,91 log UFC g⁻¹, respectivamente. O perfil de crescimento da contagem de BAL no último dia, em comparação com as contagens iniciais, demonstrou declínio ($P < 0,05$) em todos os tratamentos. Entretanto, apesar da diminuição, os valores obtidos foram significativamente maiores em FLP, ELP, FLR e ELR (8,71; 10,25; 10,26 e 12,27 log UFC g⁻¹, respectivamente), em comparação ao tratamento controle (4,77 log

UFC g⁻¹). Os resultados corroboram com os relatados por Ayyash et al. (2019), cujas as populações de BAL no produto cárneo com adição de probiótico, aumentaram significativamente durante o estudo, apresentando diminuição ($P < 0,05$) ao final dos 14 dias de armazenamento.

Figura 9 – Contagem de bactérias ácido lácticas em hambúrgueres com adição de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* durante o armazenamento refrigerado.



Médias \pm desvio padrão. Letras minúsculas diferentes (a,b,c,d) são significativamente (ANOVA $P < 0,05$) diferentes entre os dias de armazenamento na mesma formulação. Letras maiúsculas diferentes (A,B,C,D,E) são significativamente (ANOVA $P < 0,05$) diferentes entre as formulações em um mesmo dia de armazenamento. C: Controle sem adição de probióticos; FLP= Adição de células livres *L. plantarum*; ELP= Adição de *L. plantarum* em cápsulas; FLR= Adição de células livres de *L. rhamnosus*; ELR= Adição de *L. rhamnosus* em cápsulas.

Embora, inicialmente, as BAL possam ter sofrido o impacto da baixa temperatura de armazenamento, foram capazes de se adaptar e manter atividade de multiplicação celular sob refrigeração nos dias seguintes, sobretudo em ELP e ELR. As baixas temperaturas aumentam a estabilidade das células encapsuladas, mas não afetam o metabolismo dos microrganismos imobilizados, que permanecem ativos nas partículas (PEDROSO et al., 2012). O acréscimo ($P < 0,05$) nas populações de BAL observado nos hambúrgueres tratados com probióticos representa um benefício tecnológico, uma vez que as BAL são os principais agentes promotores de melhorias na qualidade de produtos cárneos (Leroy et al., 2013; Smaoui et al., 2017).

6.3.3. CONTAGENS SELETIVAS DE *L. plantarum* E *L. rhamnosus*

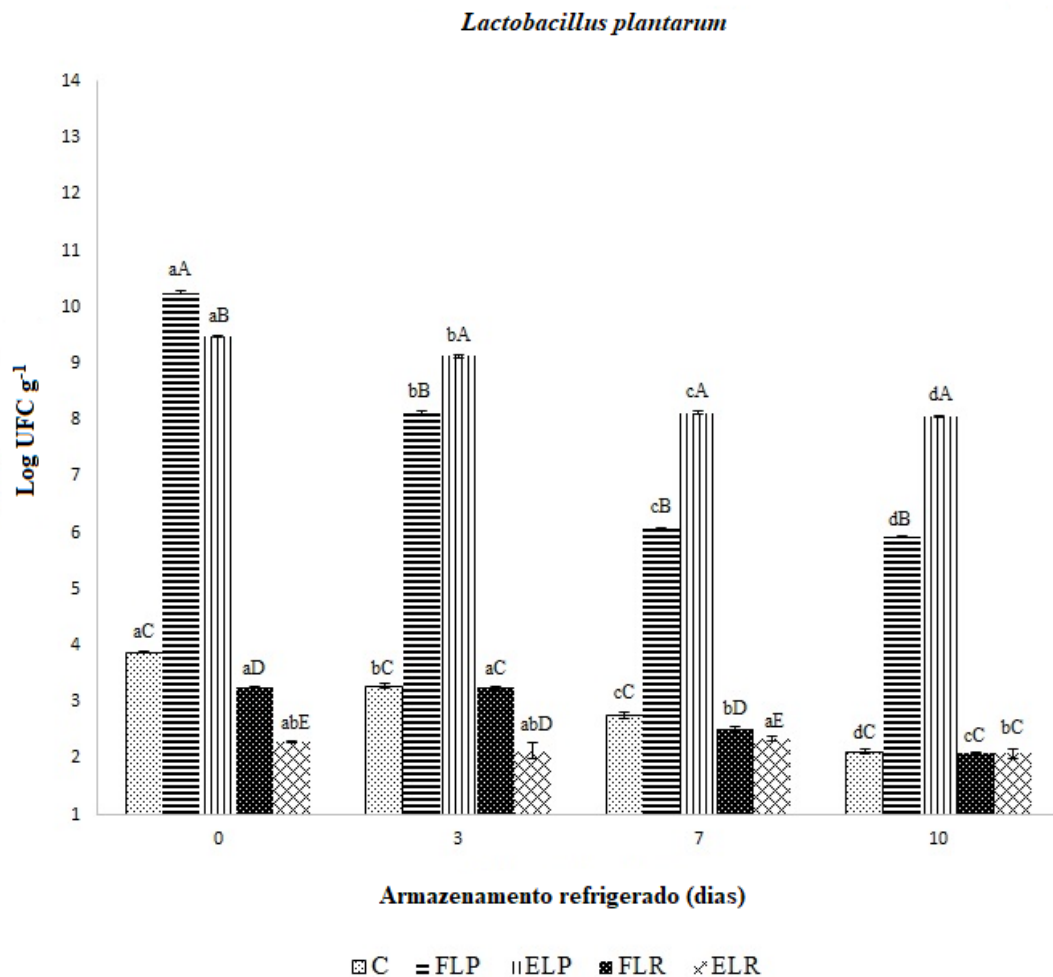
É fundamental distinguir os microrganismos probióticos intencionalmente adicionados das populações de BAL que fazem parte da microbiota naturalmente presente na carne e produtos cárneos. Portanto, os resultado das contagens seletivas de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* estão expressos na Figura 10 e 11, respectivamente.

Como esperado, o tratamento controle manteve as contagens mais baixas ($P < 0,05$) de *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, já que não houve adição proposital desses microrganismos. Entretanto, mesmo em C foi possível contabilizar a presença de ambas as espécies, o que comprova que os níveis de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* encontrados neste tratamento são da originários da própria matriz utilizada na elaboração do hambúrguer, uma vez que ambas as espécies fazem parte da microbiota autóctone das carnes (DALLA SANTA et al., 2014; MUNEKATA et al., 2020).

Conforme observado houve um decréscimo progressivo em função do tempo de armazenamento nas contagens de *L. plantarum* incorporado no hambúrguer, tanto na forma de célula livre (de 10,26 para 5,93 log UFC g⁻¹) como em cápsulas de alginato (de 9,47 para 8,06 log UFC g⁻¹) (Figura 10). Entretanto, embora a viabilidade de *L. plantarum* tenha reduzido significativamente durante o estudo, as cápsulas promoveram melhor estabilidade às bactérias em comparação com as formas livres, conferindo a manutenção de contagens acima de 8 log UFC g⁻¹ até o final do armazenamento. De modo similar, Cavalheiro et al. (2019a) relataram perda inferior a 2 log UFC g⁻¹ nas contagem de *L. plantarum* encapsulados entre o início e o fim da maturação (20 dias) de "chorizo". Os autores verificaram que dentre as

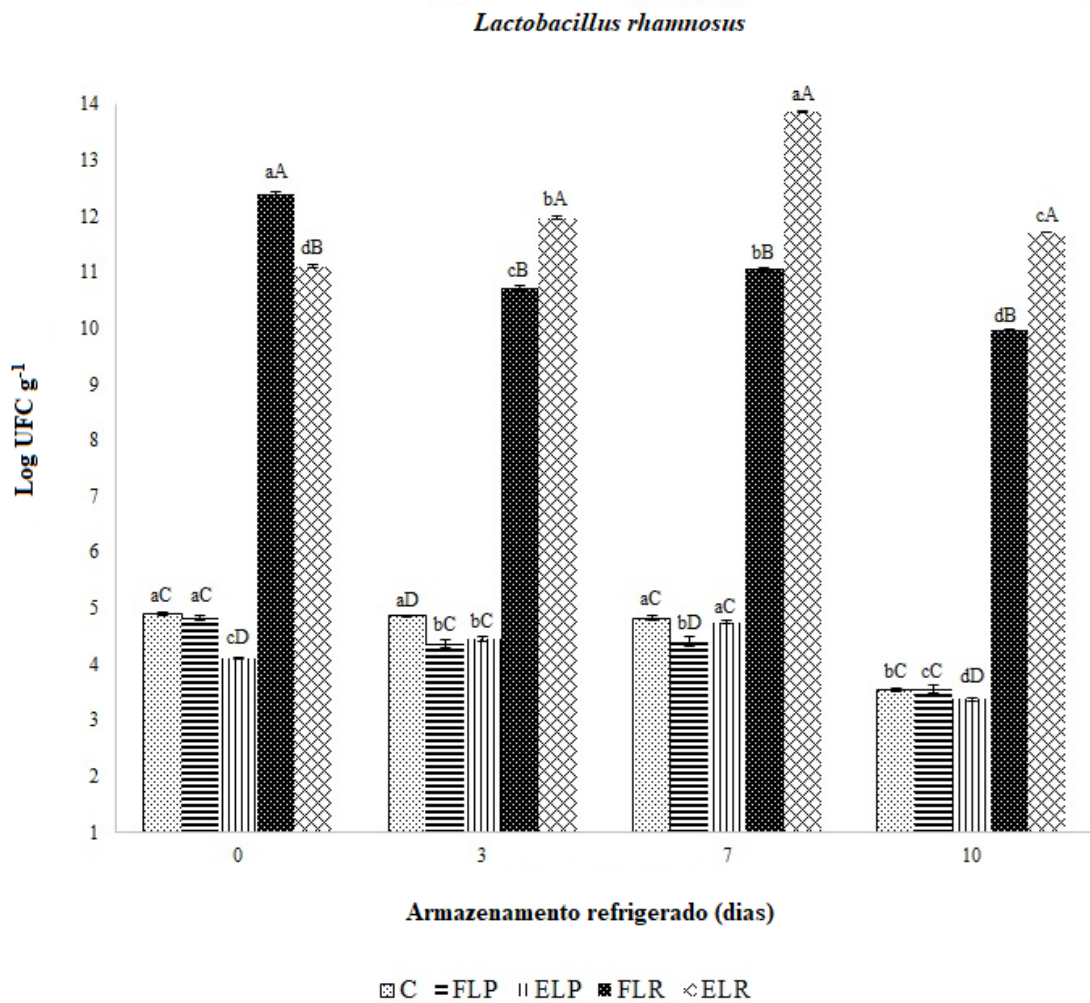
alternativas testadas, a incorporação por cápsulas de alginato provou ser a melhor opção para incorporação de probióticos em chouriço porque mantiveram as maiores contagens de probióticos durante o amadurecimento.

Figura 10 – Contagem seletiva de *L. plantarum* em hambúrgueres com adição de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* durante o armazenamento refrigerado.



Médias \pm desvio padrão. Letras minúsculas diferentes (a,b,c,d) são significativamente (ANOVA $P < 0,05$) diferentes entre os dias de armazenamento na mesma formulação. Letras maiúsculas diferentes (A,B,C,D,E) são significativamente (ANOVA $P < 0,05$) diferentes entre as formulações em um mesmo dia de armazenamento. C: Controle sem adição de probióticos; FLP= Adição de células livres *L. plantarum*; ELP= Adição de *L. plantarum* em cápsulas; FLR= Adição de células livres de *L. rhamnosus*; ELR= Adição de *L. rhamnosus* em cápsulas.

Figura 11 – Contagem seletiva de *L. rhamnosus* em hambúrgueres com adição de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* durante o armazenamento refrigerado.



Médias \pm desvio padrão. Letras minúsculas diferentes (a,b,c,d) são significativamente (ANOVA $P < .05$) diferentes entre os dias de armazenamento na mesma formulação. Letras maiúsculas diferentes (A,B,C,D) são significativamente (ANOVA $P < .05$) diferentes entre as formulações em um mesmo dia de armazenamento. C: Controle sem adição de probióticos; FLP= Adição de células livres *L. plantarum*; ELP= Adição de *L. plantarum* em cápsulas; FLR= Adição de células livres de *L. rhamnosus*; ELR= Adição de *L. rhamnosus* em cápsulas.

As contagens seletivas para *L. rhamnosus* exibiram comportamento diferente para cada estratégia de incorporação utilizada (Figura 11). Entre os dias 0 e 3 de armazenamento as

células livres adicionadas (FLR) sofreram redução (de 12,40 para 10,71 log UFC g⁻¹) (P < 0,05) na população de *L. rhamnosus*, seguida de aumento (11,06 log UFC g⁻¹) significativo no sétimo dia e nova diminuição (9,96 log UFC g⁻¹) ao final dos 10 dias. Por outro lado, no tratamento ELR, as contagens aumentaram de forma significativa (de 11,10 para 13,86 log UFC g⁻¹) até o sétimo dia de armazenamento. No 10º dia de estocagem refrigerada, foi observada uma redução (P < 0,05), entretanto mesmo com essa perda celular no final do armazenamento, as contagens mantiveram-se significativamente maiores (11,71 log UFC g⁻¹) que as iniciais. Este mesmo padrão de crescimento foi observado nas contagens de BAL (Figura 9) o que reforça que os microrganismos incorporados foram também contabilizados na metodologia de contagem deste grupo de bactérias, justificando a importância da análise seletiva das espécies adicionadas propositalmente. Do mesmo modo ao que foi verificado na contagem de *L. plantarum*, os resultados das contagens seletivas de *L. rhamnosus* demonstraram os efeitos da proteção conferida pelo encapsulamento celular, uma vez que tanto ELP como ELR apresentaram melhor estabilidade durante a armazenagem refrigerada.

O comparativo entre o número de células obtidas no dia 0 e o número de células recuperadas no final do armazenamento demonstrou redução de 42,20%, 14,88% e 19,67% em FLP, ELP e FLR, respectivamente, além do aumento de 5,49% nas contagens em ELR. Estes resultados comprovam que as cápsulas de alginato desenvolvidas no presente estudo foram capazes de promover a proteção de ambas as cepas durante o armazenamento de hambúrguer sob refrigeração. Similarmente, Ünal Turhan et al. (2017), em estudo com a incorporação de probióticos em embutido fermentado, relataram que as cápsulas de alginato conferiram sobrevivência 10,25% maior ao *L. rhamnosus*, em comparação com a viabilidade observada no tratamento com adição de células livres.

Os resultados obtidos demonstram ainda que a cepa de *L. rhamnosus* utilizada possui maior capacidade de adaptação ao hambúrguer e a temperaturas mais baixas, uma vez que, mesmo quando adicionada sem a proteção da cápsula (FLR), manteve contagem superior a 9 log UFC g⁻¹. Segundo Nukaekul et al. (2012), para a garantia dos efeitos benéficos, a concentração mínima de probiótico nos alimentos deve estar entre 6 e 7 log UFC g⁻¹ no momento do consumo. Nesse contexto, os tratamentos ELP, FLR e ELR estariam de acordo com as exigências, apresentando contagens superiores a 8 log UFC g⁻¹ durante todo o armazenamento do hambúrguer.

É de conhecimento amplo que ocorre perda celular durante tratamentos térmicos, e uma vez que hambúrguer é um produto que passa por cozimento antes do consumo, é certo pressupor que a viabilidade dos probióticos será afetada. Cavalheiro et al. (2019b) relataram

que a viabilidade celular de *L. plantarum* não encapsulado foi reduzida de 10,2 para 5,6 log UFC mL⁻¹ após 5 minutos de exposição a 80 °C, enquanto nas mesmas condições, as células encapsuladas reduziram de 9,6 para 8,2 log UFC g⁻¹. Abbaszadeh et al. (2014) verificaram que a taxa de sobrevivência de *L. rhamnosus* encapsulado foi 1,7 a 13, 1,8 a 26,8 e 18,6 a 255 vezes maior que das bactérias não encapsuladas a 55, 60 e 65 °C por 30 minutos, respectivamente. Os estudos citados comprovam que as técnicas de encapsulamento aumentam significativamente a sobrevivência de probióticos durante exposições térmicas, portanto é possível que mesmo após o cozimento dos hambúrgueres, mantenham-se níveis satisfatórios de viabilidade probiótica.

6.3.4. CONTAGEM DE MICRORGANISMOS POTENCIALMENTE PATOGÊNICOS

Os níveis de coliformes a 35 e 45 °C no dia 0 de armazenamento foram > 1.100 NMP g⁻¹ em todos os tratamentos realizados. Ao final do estudo os resultados obtidos em FLP, ELP, FLR e ELR para coliformes totais (35 °C) diminuíram (P < 0,05) para 210, 35, 9,2 e 11, e para coliformes termotolerantes (45 °C) reduziram significativamente para 35, 28, < 3 e < 3 NMP g⁻¹, respectivamente. No entanto, em ambas as enumerações, o tratamento controle manteve-se com os níveis iniciais inalterados até o final do armazenamento.

Os resultados obtidos revelam que a adição de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* no hambúrguer, seja na forma livre ou encapsulada, promoveu efeito inibitório frente ao grupo dos coliformes. Além disso, FLR e ELR apresentaram as menores (P < 0,05) taxas de coliformes após os 10 dias de armazenamento, o que pode estar associado aos índices de pH mais baixos observados nestes tratamentos (Tabela 6). Alguns autores associam os efeitos inibitórios observados pela adição de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* com a produção de substâncias antimicrobianas durante o metabolismo fermentativo destas bactérias, como ácido láctico e bacteriocinas (SARIKA et al., 2010; SILVA SABO et al., 2014; SMAOUI et al., 2016). Nedelcheva et al. (2010) demonstraram a bacteriocina produzida por *L. plantarum* NBIMCC 2415 foi capaz de inibir o crescimento de duas cepas de *E. coli* (ATCC 25922, ATCC 8739), conhecidamente representantes do grupo coliformes.

Não foi detectada *E.coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* spp. em nenhum dos tratamentos analisados. Resultado que está de acordo com os padrões microbiológicos exigidos para alimentos prontos para oferta ao consumidor, como o

hambúrguer, previstos na legislação brasileira (BRASIL, 2019b).

Estes resultados comprovam que as cepas estudadas têm potencial para serem utilizadas na biopreservação de alimentos, uma vez que foram capazes de reduzir a carga de coliformes presente na matriz cárnea, melhorando a qualidade higiênico-sanitária do hambúrguer.

7. CONCLUSÕES

O encapsulamento de *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, por gelificação inônica externa, utilizando de alginato de sódio, leite em pó, farinha de banana verde e goma xantana, resultou em um alto rendimento de encapsulação (superior a 83% para ambos microrganismos).

A cápsula elaborada foi capaz de conferir maior estabilidade às células, melhorando a sobrevivência às condições simuladas do TGI e a viabilidade de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* durante o armazenamento refrigerado.

Houve influência do tempo de armazenamento nos parâmetros de cor, pH, oxidação lipídica e contagens celulares. A incorporação das cepas de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* suprimiu ($P < 0,05$) a perda do teor de vermelho, reduziu o pH, melhorou os parâmetros de textura (dureza, mastigabilidade e coesividade), reduziu a oxidação lipídica e revelou potencial antioxidante. A incorporação dos microrganismos demonstrou, ainda, efeito inibitório sobre a população de coliformes a 35 e 45 °C, o que indica provável produção de substâncias antimicrobianas e potencial para uso como agentes de bioproteção em produtos cárneos frescos.

No que diz respeito à estratégia de inoculação na carne de hambúrguer, a incorporação em cápsulas provou ser a melhor alternativa para agregar *L. plantarum* e *L. rhamnosus* em hambúrguer, uma vez que os tratamentos ELP e ELR exibiram contagens de células viáveis superiores a 8 e 11 log UFC g⁻¹, respectivamente, após 10 dias de armazenamento.

Os efeitos da incorporação das cepas estudadas, sobretudo no tratamento ELR, notavelmente melhorou a qualidade dos hambúrgueres durante o armazenamento refrigerado, além de resultar em um produto com elevado potencial probiótico.

Serão necessários mais estudos buscando comprovar os efeitos antioxidantes, verificar a produção de bacteriocinas, bem como avaliar a proteção térmica conferida pelas cápsulas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASZADEH, S.; GANDOMI, H.; MISAGHI, A.; BOKAEI, S.; NOORI, N. The effect of alginate and chitosan concentration on some properties of chitosan-coated alginate beads and survivability of encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* in simulated gastrointestinal conditions and during heat processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 11, p. 2210-2216, 2014.

AGGARWAL, J.; SWAMI, G.; KUMAR, M. Probiotics and their Effects on Metabolic Diseases: An Update. **Journal of Clinical and Diagnostic Research for doctors**, v.7, n. 1, p. 173-177, 2013.

AHMAD, M.; GANIB, A.; HAMEDC, F.; MAQSOOD, S. Comparative study on utilization of micro and nano sized starch particles for encapsulation of camel milk derived probiotics (*Pediococcus acidolactici*). **LWT - Food Science and Technology journal**, v. 110, p. 231–238, 2019.

ANUKAM, K. C.; REID, G. Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's Observation. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology** A. Méndez-Vilas (Ed.), 2007.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Committee on Microbiological for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, 4.Ed., p. 659, 2013.

ASHWAR, B. A., GANI, A., SHAH, A., WANI, I. A., & MASOODI, F. A. Preparation, health benefits and applications of resistant starch-a review. **Starch/Starke**, v. 68, p. 287–301, 2016.

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.

AYYASH, M.; LIU, S.; AL MHEIRI, A.; ALDHAHERI, M.; RAEISI, B.; AL-NABULSI, A.; OSAILI, T.; OLAIMAT, A. In vitro investigation of healthpromoting benefits of fermented camel sausage by novel probiotic *Lactobacillus plantarum*: a comparative study with beef sausages. **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, p. 346–354, 2019.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. ANVISA. **Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999**. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Brasília, 1999.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. ANVISA. **Comissões de assessoramento tecnocientífico em alimentos funcionais e novos alimentos**. Aprova alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Brasília, 2008.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. ANVISA, **Resolução da Diretoria Colegiada nº 241, de 26 de julho de 2018**. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Brasília, 2018.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. ANVISA. **Comissões de assessoramento tecnocientífico em alimentos funcionais e novos alimentos**. Dispõe sobre alimentos com alegações de propriedade funcional aprovadas. Brasília, 2019a.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. ANVISA. **Instrução normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019**. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos prontos para oferta ao consumidor. Brasília, 2019b.

BALTHAZAR, C. F., SILVA, H. L. A., CAVALCANTI, R. N., ESMERINO, E. A., CAPPATO, L. P., ABUD, Y. K. D.; MORAES, J.; ANDRADE, M.M.; FREITAS, M.Q.; SANT'ANNA, C.; RAICES, R.S.L.; SILVA, M.C.; CRUZ, A. G. Prebiotics addition in sheep milk ice cream: A rheological, microstructural and sensory study. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 564–573, 2017.

BLAIOTTA, G.; MURRU, N.; DI CERBO, A.; ROMANO, A.; APONTE, M. Production of probiotic bovine salami using *Lactobacillus plantarum* 299v as adjunct. **Journal Science of Food and Agriculture**, v. 98, p. 2285-2294, 2018.

BEN SLIMA, S.; KTARI, N.; TRABELSI; I.; TRIKI; M.; FEKI-TOUNSI, M.; MOUSSA, H.; MAKNI, I.; HERRERO, A.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F.; RUIZ-CAPILLAS, C.; BEN SALAH, R. Effect of partial replacement of nitrite with a novel probiotic *Lactobacillus plantarum* TN8 on color, physico-chemical, texture and microbiological properties of beef sausages. **LWT - Food Science and Technology**, v. 86, p. 219-226, 2017.

BEN SLIMA, S.; KTARI, N.; TRIKI; M.; TRABELSI, I.; ABDESLAM, A.; MOUSSA, H.; MAKNI, I.; HERRERO, A.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F.; RUIZ-CAPILLAS, C.; BEN SALAH, R. Effects of probiotic strain, *Lactobacillus plantarum* TN8 and *Pediococcus acidilactici*, on microbiological and physico-chemical characteristics of beef sausages. **LWT - Food Science and Technology**, v. 92, p. 195-2013, 2018.

BEN SLIMA, S.; TRABELSI; I.; KTARI, N.; KRIAA, M.; ABDESLAM, A.; HERRERO, A.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F.; RUIZ-CAPILLAS, C.; BEN SALAH, R. Modeling the influence of functional additives in beef sausages using a Box-Benkhen design: Effects on quality characteristics. **Food Bioscience**, v. 35, 2020.

BILENLER, T.; KARABULUT, I.; CANDOGAN, K. Effects of encapsulated starter cultures on microbial and physicochemical properties of traditionally produced and heat treated sausages (sucuks). **LWT - Food Science and Technology**, v.75, p. 425-433, 2017.

BINDA, S.; HILL, C.; JOHANSEN, E.; OBIS, D.; POT, B.; SANDERS, M.E.; TREMBLAY, A.; OUWEHAND, A.C. Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary Supplements. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.

BIS-SOUZA, C.V.; PATEIRO, M.; DOMÍNGUEZ, R.; PENNA, A.L.B.; LORENZO, J.M.; SILVA BARRETTO, A.C.S. Impact of fructooligosaccharides and probiotic strains on the quality parameters of low-fat Spanish Salchichón. **Meat Science**, v. 159, p. 1-10, 2020.

BIXQUERT, J.M. Treatment of irritable bowel syndrome with probiotics: an etiopathogenic approach at last. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, v.101, p.553-564, 2009.

BOMDESPACHO, L. Q.; CAVALLINI, D. C. U.; ZAVARIZI, A. C. M.; PINTO, R. A.; ROSSI, E. A. Evaluation of the use of probiotic acid lactic bacteria in the development of chicken hamburger. **International Food Research Journal**, v. 21, p. 965–972, 2014.

BUJALANCE, C.; JIMÉNEZ-VALERA, M.; MORENO, E.; RUIZ-BRAVO, A. A selective differential medium for *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, p. 572-575, 2006.

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, n.4, p. 467–483, 2011.

CAVALHEIRO, C.P.; RUIZ-CAPILLAS, C.; HERRERO, A.M.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F.; MENEZES, C.R.; FRIES, L.L.M. Application of probiotic delivery systems in meat products. **Trends in Food Science & Technology**, v.46, p. 120-131, 2015.

CAVALHEIRO, C.P.; RUIZ-CAPILLAS, C.; HERRERO, A.M.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F.; PINTADO, T.; MENEZES, C.R.; FRIES, L.L.M. Effect of different strategies of *Lactobacillus plantarum* incorporation in chorizo sausages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, p. 6706–6712, 2019a.

CAVALHEIRO, C.P.; RUIZ-CAPILLAS, C.; HERRERO, A.M.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F.J.; MENEZES, C.R.; FRIES, L.L. Survival of probiotic *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecium* in alginate beads during stress treatments. **Nutrition & Food Science**, v. 49, p.273–283, 2019b.

CAVALHEIRO, C.P.; RUIZ-CAPILLAS, C.; HERRERO, A.M.; JIMÉNEZ-COLMENERO, PINTADO, T.; MENEZES, C.R.; FRIES, L.L.M. Effect of encapsulated *Lactobacillus plantarum* as probiotic on dry-sausages during chilled storage. **International Journal of Food Science & Technology**, 2020.

CHAIJAN, M. Review: Lipid and myoglobin oxidations in muscle foods. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 30, n.1, p. 47-53, 2008.

CHARALAMPOPOULOS, D.; WANG, R.; PANDIELLA, S.S.; WEBB, C. Application of cereals and cereal components in functional foods: A review. **International Journal Food Microbiology**, v. 79, p. 131–141, 2002.

CHEN, L., YANG, T., SONG, Y., SHU, G., CHEN, H. Effect of xanthan-chitosan-xanthan double layer encapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB01 in simulated gastrointestinal conditions, bile salt solution and yogurt. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 274 - 280, 2017.

CHENG, J. Lipid oxidation in meat. **Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 6, n. 3, p. 1-3, 2016.

COOK, M.T.; TZORTZIS, G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; KHUTORYANSKIY, V.V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 1, p. 56-67, 2012.

CORBO, M. R., BEVILACQUA, A., SPERANZA, B., MAGGIO, B. D., GALLO, M., SINIGAGLIA, M. Use of alginate beads as carriers for lactic acid bacteria in a structured system and preliminary validation in a meat product. **Meat Science**, v. 111, p. 198 - 203, 2016.

CORRÊA-FILHO, L. C., MOLDÃO-MARTINS, M., & ALVES, V. D. Advances in the application of microcapsules as carriers of functional compounds for food products. **Applied Sciences**, v. 9, 2019.

DALLA SANTA, O. R.; MACEDO, R.E.F.; DALLA SANTA, H.S.; ZANETTE, C.M.; FREITAS, R.J.S.; TERRA, N.N. Use of starter cultures isolated from native microbiota of artisanal sausage in the production of Italian sausage. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 4, p. 780-786, 2014.

DANTAS, A. B.; JESUS, V. F.; SILVA, R.; ALMADA, C. N.; ESMERINO, E. A.; CAPPATO, L. P.; CRUZ, A. G. Manufacture of probiotic Minas Frescal cheese with *Lactobacillus casei*. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 1, p. 18–30, 2016.

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

DE PRISCO, A., MAURIELLO, G. Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 27 – 39, 2016.

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

DE VRESE, M.; SCHEREZENMEIR, J. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 111, p.1-66, 2008.

DIAS, M.I.; FERREIRA, I.C.F.R.; BARREIRO, M.F. Microencapsulation of bioactives for food applications. **Food & Function**, v. 6, n 4, p. 1035-1052, 2015.

DOHERTY, S. B.; GEE, V. L.; ROSS, R. P.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; BRODKORB, A. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1604–1617, 2011.

DOLLY, P., ANISHAPARVIN, A., JOSEPH, G. S., & ANANDHARA MAKRISHNAN, C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) by spray-freeze drying method and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 6, p. 568 – 574, 2011.

DOMÍNGUEZ, R., PATEIRO, M., GAGAOUA, M., BARBA, F. J., ZHANG, W. & LORENZO, J. M. A Comprehensive Review on Lipid Oxidation in Meat and Meat Products. **Antioxidants**, v. 8, n. 10, E429, 2019.

DOUGLAS, L. C., & SANDERS, M. E. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 108, p. 510-521, 2008.

ENGLYST, H. N.; KINGMAN, S. M.; JUDSON, G. J.; CUMMINGS, J. H. Measurement of resistant starch in vitro and in vivo. **British Journal of Nutrition**, v.75, p. 749 – 755, 1996.

EMSER, K.; BARBOSA, J.; TEIXEIRA, P.; MORAIS, A.M.M.B. *Lactobacillus plantarum* survival during the osmotic dehydration and storage of probiotic cut apple. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 519-528, 2017.

ETCHEPARE, M.A., RADDATZ, G.C; CICHOSKI, A.J.; FLORES, E.M.M.; BARIN, J.S.; ZEPKA, L.Q., JACOB-LOPES, E., GROSSO, C.R.F.; MENEZES, C.R. Effect of resistant starch (Hi-maize) on the survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 321–329, 2016a.

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, 2016b.

ETCHEPARE, M.A.; NUNES, G.L.; NICOLOSO, B.R.; BARIN, J.S.; FLORES, E.M.M.; MELLO, R.O.; MENEZES, C.R. Improvement of the viability of encapsulated probiotics using whey proteins. **LWT – Food Science and Technology**, v. 117, 2020.

FALOWO, A.B.; FAYEMI, P.O.; MUCHENJE V. Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review **Food Research International**, v. 64, p. 171-181, 2014.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. **Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Meeting Report**. Canada, 2002.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **A tecnologia da encapsulação de ingredientes**, n. 42, p. 19-26, 2017. Disponível em: < www.revista-fi.com > Acesso: outubro de 2019.

JAFARI M.; MORTAZAVIANA A. M.; HOSSEINI, H.; SAFAEI, F.; KHANEGHAH, A.; SANT'ANA, A. S. Probiotic *Bacillus*: fate during sausage processing and storage and influence of different culturing conditions on recovery of their spores. **Food Research International**, v. 95, p. 46–51, 2017.

GALLI, B. D., BAPTISTA, D. P., CAVALHEIRO, F. G., NEGRÃO, F., EBERLIN, M. N., GIGANTE, M. L. Peptide profile of camembert-type cheese: Effect of heat treatment and adjunct culture *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Food Research International**, v. 123, p. 393–402, 2019.

GIRAFFA, G.; CHANISHVILI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 480-487, 2010.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G., LLAVATA-CABRERO, B., MARTINEZ-SANZ, M., FABRA, M. J., LOPEZ-RUBIO, A. Self-assembled gelatin- ι -carrageenan encapsulation structures for intestinal targeted release applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 517, p. 113-123, 2018.

GUERRA, A.F.; LEMOS JUNIOR, W.J.F.; ANDRIGHETTO C.; GIACOMINI, A.; CORICH, V.; LUCHESE, R.H; *Lactobacillus paracasei* probiotic properties and survivability under stressinduced by processing and storage of ice cream bar or ice- lolly. **Ciência Rural**, v. 48, 2018.

GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; NAZZARO, F.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 292-302, 2010.

GOH, C.H.; HENG, P.W.S.; CHAN, L.W. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p. 1-12, 2012.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, 330-347, 2004.

GRASSO, S., BRUNTON, N. P., LYNG, J. G., LALOR, F., MONAHAN, F. J. Healthy processed meat products-regulatory, reformulation and consumer challenges. **Trends in Food Science and Technology**, v. 39, p. 4–17, 2014.

HABIBI, H., & KHOSRAVI-DARANI, K. Effective variables on production and structure of xanthan gum and its food applications: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 130–140, 2017.

HEMPEL S, NEWBERRY S.J., MAHER A.R., WANG Z., MILES J.N.V., SHANMAN R., JOHNSEN, B., SHEKELLE, P.G. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. **Journal of the American Medical Association**, v. 307, n. 18, p. 1959-1969, 2012.

HILL C, G FRANCISCO, REID GREGOR, GIBSON GR, MERESTEIN DJ, POT B, MORELLI L, CANANI RB, FLINT HJ, SALMINEN S, CALDER PC, SANDERS ME. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, p. 506 - 514, 2014.

HOMAYOUNI, A.; AMINI, A.; KESHTIBAN, A. K.; MORTAZAVIAN, A. M.; ESAZADEH, K.; & POURMORADIAN, S. Resistant starch in food industry: a changing outlook for consumer and producer. **Starch/Staerke**, v. 66, p.102-114, 2014.

HUGUES-AYALA, A.M.; SARABIA-SAINZ, J.A.; GONZÁLEZ-RIOS, H.; VÁZQUEZ-MORENO, L.; MONTFORT, G.R.C. Airbrush encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in dry microbeads of alginate coated with regular buttermilk proteins. **LWT - Food Science and Technology**, v. 117, p. 1-7, 2020.

KHALILI SADAGHIANI, S.; ALIAKBARLU, J.; TAJIK, H.; MAHMOUDIAN, A. Anti-listeria activity and shelf life extension effects of *Lactobacillus* along with garlic extract in ground beef. **Journal of Food Safety**, v. 39, 2019.

KONAR, N.; PALABIYIK, I.; TOKER, O.S.; POLAT, D.G.; KELLECI, E.; PIROUZIAN, H.R. Conventional and sugar-free probiotic white chocolate: Effect of inulin DP on various quality properties and viability of probiotics. **Journal of Functional Foods**, v. 43, p. 206-213, 2018.

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

KRASAEEKOOPT, W.; WATCHARAPOKA, S. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. **LWT – Food Science and Technology**, v. 57, p. 761–766, 2014.

KUMAR, M; KUMAR, A.; NAGPAL, R.; MOHANIA, D.; BEHARE, P.; VERMA, V.; KUMAR, P.; PODDAR, D.; AGGARWAL, P.K.; HENRY, C.J.K; JAIN, S.; YADAV, H. Cancer-preventing attributes of probiotics: un update. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 61, n. 5, p. 473-496, 2010.

KUMAR, B.V.; VIJAYENDRA, S.V.; REDDY, O.V.S. Trends in dairy and non-dairy probiotic products – a review. **Journal Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 6112-6124, 2015.

LEROY, F., GEYZEN, A., J. M., DE VUYST, L., & SCHOLLIERS, P. Meat fermentation at the crossroads of innovation and tradition: A historical outlook. **Trends in Food Science & Technology**, v. 31, p. 130 –137, 2013.

LIU, L., QU, X., XIA, Q., WANG, H., CHEN, P., LI, X., WANG, L., YANG, W., Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on the antioxidant activity of Cheddar cheese during ripening and under simulated gastrointestinal digestion. **LWT - Food Science and Technology**, v. 95, p. 99-106, 2018.

MADUREIRA, A. R., AMORIM, 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.

MILTENBURG, G. A. J.; WENSING, T. H.; SMULDERS, F. J. M. Relationship between blood hemoglobin, plasma and tissue iron, muscle heme pigment, and carcass color of veal. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 2766 - 2772, 1992.

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

MIZI, L., COFRADES, S., BOU, R., PINTADO, T., LÓPEZ-CABALLERO, M. E., ZAIDI, F., JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Antimicrobial and antioxidant effects of combined high-pressure processing and sage in beef burgers during prolonged chilled storage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 51, p. 32-40, 2019.

MORA-GALLEGO; H.; SERRA, X.; GUARDIÀ, M.D.; MIKLOS, R.; LAMETSCH, R.; ARNAU, J. Effect of the type of fat on the physicochemical, instrumental and

sensory characteristics of reduced fat non-acid fermented sausages. **Meat Science**, v.93, p. 668–674, 2013.

MOUNTS, L., SUNKARA, R., SHACKELFORD, L., OGUTU, S., WALKER, L.T., VERGHESE, M. Feeding Soy with Probiotic Attenuates Obesity-Related Metabolic Syndrome Traits in Obese Zucker Rats. **Food and Nutrition Sciences**, v.6, p. 780-789, 2015.

MUCHENJEA, V.; DZAMAC, B.K.; CHIMONYO, M.; STRYDOM, P. E.; HUGO, A.; RAATS, J. G. Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: a review. **Food Chemistry**, v.112, p. 279-289, 2009.

MUHAMMAD, Z., RAMZAN, R., HUO, G.C., TIAN, H., BIAN, X. Integration of polysaccharide-thermoprotectant formulations for microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*, appraisal of survivability and physico-biochemical properties during storage of spray dried powders. **Food Hydrocolloids**, v. 66, p. 286-295, 2017

MUNEKATA, P.E.S.; PATEIRO, M.; ZHANG, W.; DOMÍNGUEZ, R.; XING, L.; FIERRO, E.M.; LORENZO, J.M. Autochthonous Probiotics in Meat Products: Selection, Identification, and Their Use as Starter Culture. **Microorganisms**, v. 8, p. 1833 – 1853, 2020.

MUTHUKUMARASAMY, P.; HOLLEY, R. A. Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, n. 2, p. 164-169, 2006.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; SADA, A.; ORLANDO, P. Fermentation ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, v.1, p. 319-323, 2009.

NEDELICHEVA, P.; DENKOVA, Z.; DENEV, P.; SLAVCHEV, A.; KRASTANOV, A. Probiotic Strain *Lactobacillus plantarum* NBIMCC2415 with Antioxidant Activity as a Starter Culture in the Production of Dried Fermented Meat Products. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 24, p. 1624-1630, 2010.

NISSEN, L.; CHINGWARU, W.; SGORBATI, B.; BIAVATI, B.; CENCIC, A. Gut health promoting activity of new putative probiotic/protective *Lactobacillus* spp. Strains: a functional study in the small intestinal cell model. **International Journal of Food Microbiology**, v.135, p. 288-294, 2009.

NULKAEKUL, 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.

OBEROI, K.; TOLUN, A.; SHARMA, K.; SHARMA, S. Microencapsulation: an overview for the survival of probiotic bacteria. **Journal Microbiology Biotechnology Food Sciences**, v. 9, n. 2, p. 280-287, 2019.

OVANDO-MARTINEZ, M.; SÁYAGO-AYERDI, S.; AGAMA-ACEVEDO, E.; GOÑI, I.; BELLO-PÉREZ, A. Unripe banana flour as an ingredient to increase the undigestible carbohydrates of pasta. **Food Chemistry**, v. 113, p. 121–126, 2009.

OUWEHAND, A.C. A review of dose-responses of probiotics in human studies **Beneficial Microbes**, v. 8, n. 2, p.143-151, 2017.

PALANIRAJ, A.; JAYARAMAN, V. Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. **Journal of Food Engineering**, v. 106, n. 1, p. 1–12, 2011.

PASIN, B.L.; AZÓN, C.G.; GARRIGA, A.M. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. **Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v.3, p.130 - 151, 2012.

PAVLI, F.G.; KOVAIOU, I.; APOSTOLAKOPOULOU, G.; KAPETANAKOU, A.; SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G.-J.E.; TASSOU, C.C.; CHORIANOPOULOS, N.G. Alginate-Based Edible Films Delivering Probiotic Bacteria to Sliced Ham Pretreated with High Pressure Processing, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, 2017.

PAVLI, F.G.; ARGYRI, A.A.; CHORIANOPOULOS, N.G.; NYCHAS, G.-J.E.; TASSOU, C.C. Evaluation of *Lactobacillus plantarum* L125 strain with probiotic potential on physicochemical, microbiological and sensorial characteristics of dry-fermented sausages, **LWT - Food Science and Technology**, v. 118, 2020.

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

POURJAFAR, H.; NOORI, N.; GANDOMI, H.; BASTI, A.A.; ANSARI, F. Viability of microencapsulated and non-microencapsulated Lactobacilli in a commercial beverage. **Biotechnology Reports**, v. 25, p. 1-8, 2020.

RAMIREZ-CHAVARIN, M. L.; WACHER, C.; ESLAVA-CAMPOS, C. A.; PEREZ-CHABELA, M. L. Probiotic potential of thermotolerant lactic acid bacteria strains isolated from cooked meat products. **International Food Research Journal**, v. 20, p. 991-1000, 2013.

RAHARJO, S.; SOFOS, J. N. Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: a review. **Meat Science**, v. 35, p. 145-169, 1993.

RATHORE, S.; DESAI, P.M.; LIEW, C. V.; CHAN, L.W. HENG, P.W. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v.116, p. 369-381, 2013.

REALE, A.; DI RENZO, T.; ROSSI, F.; ZOTTA, T.; IACUMIN, L.; PREZIUSO, M.; PARENTE, E.; SORRENTINO, E.; COPPOLA, R. Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. **LWT – Food Science and Technology**, v. 60, p. 721-728, 2015.

RODRIGUEZ-CABEZAS, M. E.; CAMUESCO, D.; ARRIBAS, B.; GARRIDO-MESA, N.; COMALADA, M.B.; BAILÓN, E.A.; CUETO-SOLA, M. A.; UTRILLA P.A.; GUERRA-HERNÁNDEZ, E.C.; PÉREZ-ROCA, C.A.; GÁLVEZ J.A.; ZARZUELO, A.A. The combination of fructooligosaccharides and resistant starch shows prebiotic additive effects in rats. **Clinical Nutrition**, v. 29, p. 832–839, 2010.

ROGHAYEH, A.S.; HEDAYAT, H.; DOLLY, B.; FRANCISCO, J.C.; RAMIN, K. Optimization of prebiotic sausage formulation. Effect of using b-glucan and resistant starch by D-optimal mixture design approach. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, p. 704-710, 2015.

ROUXINOL-DIAS, A.L.; PINTO, A.R.; JANEIRO, C.; RODRIGUES, D.; MOREIRA, M.; DIAS, J.; PEREIRA, P. Probiotics for the control of obesity – Its effect on weight change. **Porto Biomedical Journal**, v. 1, n. 1, p. 12-24, 2016.

RUIZ, J. M. et al. Physicochemical, microbiological and sensory assessments of Italian salami with probiotic potential. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 3, p. 204-211, 2014.

SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1.ed., São Paulo: Livraria Varela, 669 p., 2011.

SANCHEZ, M.; DARIMONT, C.; DRAPEAU, V.; EMADY-AZAR, S.; LEPAGE, M.; REZZONICO, E.; LEPAGE, M.; REZZONICO, E.; NGOM-BRU, C.; BERGER, B.; PHILIPPE, L.; AMMON-ZUFFREY, C.; LEONE, P.; CHEVRIER, G.; ST-AMAND, E.; MARETTE, A.; DORÉ, J.; TREMBLAY, A. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC1.3724 supplementation on weight loss and maintenance in obese men and women. **British Journal of Nutrition**, v. 11, p. 1507-1519, 2014.

SÁNCHEZ, B.; DELGADO, S.; BLANCO-MÍGUEZ, A.; LOURENÇO, A.; Miguel GUEIMONDE, M.; MARGOLLES, A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 61, n. 1, 2017.

SANTOS, K. L.; SOUSA, F. M.; ALMEIDA, R. D.; GUSMÃO, R. P.; GUSMÃO, T. A. S. Replacement of Fat by Natural Fibers in Chicken Burgers with Reduced Sodium Content. **The Open Food Science Journal**, v. 11, p. 1 – 8, 2019.

SARIKA A.R.; LIPTON A.P.; AISHWARYA M.S. Bacteriocin production by a new isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under different culture conditions. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 2, p. 291 – 297, 2010.

SETTANNI, L., BARBACCIA, P., BONANNO, A., PONTE, M., DI GERLANDO, R., FRANCIOSI, E., DI GRIGOLI, A., GAGLIO, R. Evolution of indigenous starter microorganisms and physicochemical parameters in spontaneously fermented beef, horse, wild boar and pork salamis produced under controlled conditions. **Food Microbiology**, v. 87, p. 103–385, 2020.

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

SHARMA, M.; DEVI, M. Probiotics: a comprehensive approach toward health foods. **Critical reviews in food science and nutrition**, v, 54, n. 4, p. 537-552, 2014.

SHEU, T.Y.; MARSHALL, R.T. Microencapsulation of lactobacilli in calcium alginate gels. **Journal of Food Science**, v. 54, p. 557 – 561, 1993.

SHU, G.; HE, Y.; CHEN, L.; SONG, Y.; CAO, J.; CHEN, H. Effect of Xanthan–Chitosan Microencapsulation on the Survival of *Lactobacillus acidophilus* in Simulated Gastrointestinal Fluid and Dairy Beverage. **Polymers**, v. 10, p. 588-568, 2018.

SIEZEN, R.J.; FRANCKE, C.; RENCKENS, B.; BOEKHORST, J.; WELS, M.; KLEEREBEZEM, M.; VAN HIJUM, S.A.F.T. Complete resequencing and reannotation of the *Lactobacillus plantarum* WCFS1 genome. **Journal of Bacteriology**, v.194, p.195-196, 2012.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; DOS SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise Microbiológica de Alimentos e água**. 4. Ed. – São Paulo: Livraria Varela, Cap.19, 2010.

SILVA SABO, S.; VITOLO, M.; GONZÁLEZ, J.M.D.; OLIVEIRA, R.P.S. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 527 – 536, 2014.

SILVA, H. L. A.; BALTHAZAR, C. F.; ESMERINO, E. A.; NETO, R. P. C.; ROCHA, R. S.; MORAES, J.; CAVALCANTI, R.N.; FRANCO, R.M.; TAVARES, M.I.B.; SANTOS, J.S.; GRANATO, D.; COSTA, R.G.B; FREITAS, M.Q.; SILVA, M.C.; RAICES, R.S.L.; RANADHEERA, C.S.; NAZARRO, F.; MORTAZAVIAN, A.M.; CRUZ, A. G. Partial substitution of NaCl by KCl and addition of flavor enhancers on

probiotic Prato cheese: A study covering manufacturing, ripening and storage time. **Food Chemistry**, v. 248, p. 192-200, 2018.

SOMBOON, T.; TAKAYUKI, E.; KEN-ICHIRO, S. et al. Characterization and identification of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* strains from fermented foods in Thailand. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.38, p. 121–134, 1992.

SMAOUI, S., ELLEUCH, L., BEN SALAH, R., NAJAH, S., CHAKCHOUK-MTIBAA, A., SELLEMA, I., BESBESB, S.; MELLOULI, L. Efficient role of BacTN635 on the safety properties, sensory attributes, and texture profile of raw minced meat beef and chicken breast. **Food Additives and Contaminants: Part A**, v. 31, p. 218–225, 2014.

SMAOUI, S.; A. HSOUNA, B.; LAHMA, R.A.; ENNOURI, K.; MTIBAA-CHAKCHOUK, A.; SELLEM, I. Bio-preservative effect of the essential oil of the endemic *Mentha piperita* used alone and in combination with BacTN635 in stored minced beef meat. **Meat Science**, v. 117, p. 196-204, 2016.

SMAOUI, S.; ENNOURI, K.; MTIBAA-CHAKCHOUK, A.; KARRAY-REBAI, I.; HMIDI, M.; BOUCHAALA, K.; MELLOULI, L. Relationships Between Textural Modifications, Lipid and Protein Oxidation and Sensory Attributes of Refrigerated Turkey Meat Sausage Treated with Bacteriocin BacTN635. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, p. 1655-1667, 2017.

SMRDEL, P.; BOGATAJ, M.; ZEGA, A.; PLANINSEK, O; MRHAR, A. Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by ionotropic gelations. **Journal of Microencapsulation**, v. 25, n. 2, p. 90-105, 2008.

TALON, R.; LEBERT, I.; LEBERT, A.; LEROY S.; GARRIGA, M.; AYMERICH, T.; DROSINOS, E.H.; ZANARDI, E.; IANIERI, A.; FRAQUEZA, M.J.; PATARATA, L.;

LAUKOVA, A. Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. 1: Microbial ecosystems of processing environments. **Meat Science**, v. 77, p. 570-579, 2007.

TASAKU, S.; SIRIPORNADULSIL, S.; SIRIPORNADULSIL, W. INHIBITORY. Activity of Food-originated *Pediococcus pentosaceus* NP6 Against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Nile Tilapia By-products. **Chiang Mai J. Science**, v. 44, n. 2, p. 383-393, 2017.

TERRA, N. N. **Apontamentos sobre tecnologia de carnes**. São Leopoldo: Unisinos, 1998, p. 216.

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

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

TRIKI, M.; HERRERO, A. M.; RODRÍGUEZ-SALAS, L.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F.; RUIZ-CAPILLAS, C. Chilled storage characteristics of low-fat, n-3, PUFA-enriched dry fermented sausage reformulated with a healthy oil combination stabilized in a konjac matrix. **Food Control**, v. 31, p. 158-165, 2013.

TRABELSI, I., BEM SLIMA, S., KTARI, N., TRIKI, M., ABDEHEDI, R., ABAZA, W., MOUSSA, H., ABDESLAM, A., BEM SALAH, R. Incorporation of probiotic strain in raw minced beef meat: Study of textural modification, lipid and protein oxidation and color parameters during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 154, p. 29-36, 2019.

ÜNAL TURHAN, E.; ERGİNKAYA, Z.; POLAT, S.; ÖZER, E.A. Design of probiotic dry fermented sausage (sucuk) production with microencapsulated and free cells of *Lactobacillus rhamnosus*. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 41, p. 598-603, 2017.

ÜNAL TURHAN, E.; ERGİNKAYA, Z.; BENLİ, H.; AKIN, M.B.; AGCAM, E. The effects of microencapsulated *L. rhamnosus* and storage on biogenic amine amount of sucuk. **Gıda The Journal of Food**, v. 44, p. 819 – 825, 2019.

VILLALOBOS-DELGADO, L.H.; MATEO, J.; CARO, I.; LEAL, R.M.Y.; GUTIÉRREZ, M.N.; GÓMEZ, C.R.; GONZÁLEZ-MONDRAGÓN, E.G. **Natural antioxidants in fresh and processed meat**. C.M. Galanakis (Ed.), Sustainable meat production and processing, Academic Press, United Kingdom, Chapter 11, p. 207-236, 2019.

VILLALOBOS-DELGADO, L.H.; GONZÁLEZ-MONDRAGÓN, E.G.; RAMÍREZ-ANDRADE, J.; SALAZAR-GOVEA, A.Y.; SANTIAGO-CASTRO, J.T. Oxidative stability in raw, cooked, and frozen ground beef using Epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.). **Meat Science**, v. 168, 108187, 2020.

WANG, Z., WU, J., ZHU, L., ZHAN, X. Characterization of xanthan gum produced from glycerol by a mutant strain *Xanthomonas campestris* CCTCC M2015714. **Carbohydrate polymers**, v. 157, p. 521-526, 2017.

YANG, S.; LEE, J.; KIM, Y.; LEE, N.; PAIK, H. Antioxidant and immune-enhancing effects of probiotic *Lactobacillus plantarum* 200655 isolated from kimchi. **Food Science and Biotechnology**, v. 28, p. 491-499, 2019.

YING, D. Y.; SCHWANDER, S.; WEERAKKODY, R.; SANGUANSRI, L.; GANTENBEIN-DEMARCHIC, C.; AUGUSTIN, M.A. Microencapsulated

Lactobacillus rhamnosus GG in whey protein and resistant starch matrices: Probiotic survival in fruit juice. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 98–105, 2013.

ZUIDAM, N.J.; SHIMONI, E. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In: Zuidam N., Nedovic V. (eds).

Encapsulations Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. Springer, New York, 2010.