

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**APLICAÇÃO E VIABILIDADE DE PROBIÓTICO (*BIFIDOBACTERIUM  
ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS*) MICROENCAPSULADO EM EMBUTIDO CÁRNEO  
FERMENTADO TIPO SALAME**

Maringá – PR – Brasil  
Fevereiro de 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**APLICAÇÃO E VIABILIDADE DE PROBIÓTICO (*BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS*) MICROENCAPSULADO EM EMBUTIDO CÁRNEO FERMENTADO TIPO SALAME**

Brenda de Oliveira Gomes

Eng<sup>a</sup> de Alimentos, UFMA, 2018

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andresa Carla Feihrmann

Coorientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Guttierres Gomes

Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, área de Tecnologia e Processamento de Carne e Derivados

Maringá – PR – Brasil  
Fevereiro de 2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

G633a

Gomes, Brenda de Oliveira

Aplicação e viabilidade de probiótico (*Bifidobacterium Animalis* Subsp. *Lactis*)  
microencapsulado em embutido carneo fermentado tipo salame / Brenda de Oliveira  
Gomes. -- Maringá, PR, 2020.

44 f.: il., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Andresa Carla Feihmann.  
Coorientadora: Profa. Dra. Raquel Gutierrez Gomes.

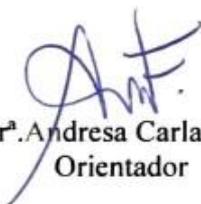
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia,  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2020.

CDD 23.ed. 664.92

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por Brenda de Oliveira  
Gomes perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia de  
Alimentos em 27 de fevereiro de 2020.

COMISSÃO JULGADORA



Prof.ª. Dr.ª. Andresa Carla Feihmann  
Orientador



Prof.ª. Dr.ª. Raquel Guttierres Gomes  
Coorientador



Prof.ª. Dr.ª. Grasielle Scaramal Madrona  
Membro



Prof.ª. Dr.ª. Lucinéia Aparecida Cestari Tonon  
Membro

Maringá – PR – Brasil  
Fevereiro de 2020

# **APLICAÇÃO E VIABILIDADE DE PROBIÓTICO (*BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS SUBSP. LACTIS*) MICROENCAPSULADO EM EMBUTIDO CÁRNEO FERMENTADO TIPO SALAME**

AUTOR: BRENDA DE OLIVEIRA GOMES

ORIENTADOR: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ANDRESA CARLA FEHRMANN

COORIENTADOR: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. RAQUEL GUTTIERRES GOMES

Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, BL 13 – 07, CEP: 87020-900 – Maringá – PR, Brasil, defendida em 27 de fevereiro de 2020.

## **RESUMO**

Os embutidos fermentados, são definidos como uma mistura de carne magra e gordura, sais de cura, açúcares, especiarias, embutidos em envoltórios e submetidos à fermentação e secagem. A aplicação de microrganismos probióticos mostra-se promissora para este tipo de produto, já que não sofrem tratamento térmico durante o processamento, não afetando a viabilidade dos microrganismos adicionados. Entretanto, devido a sensibilidade dos microrganismos às condições desafiadoras deste tipo de produto, tem-se feito uso da microencapsulação para se proteger o mesmo. Neste estudo foi desenvolvido um produto cárneo fermentado tipo Salame, adicionado de microcápsulas probióticas, onde avaliou-se a viabilidade e a estrutura das microcápsulas, bem como os efeitos sobre as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. Três formulações com diferentes quantidades de sal de cura, B1 - com 0.02% e adição de 0.7% de BB-12, B2 - com 0.01% de sal de cura e adição de 0.7% de BB-12 e um controle (C) com 0.02 % de sal de cura e sem probiótico, foram elaboradas. Durante o período de fermentação e maturação (12 dias) até o final do armazenamento (28 dias), realizou-se análises físico-químicos (pH, atividade de água, oxidação lipídica e cor instrumental), microbiológicas (coliformes fecais a 35 °C e a 45 °C, e Salmonella) e sensoriais dos salames. A adição de microcápsulas contendo BB-12 não afetou as características físico-químicas dos salames, estando os resultados dentro do esperado para este tipo de produto. Entretanto, os salames do tratamento B2 (0,02% de sais de cura), obtiveram melhor aceitação sensorial, com notas próximas de 7, para todos os parâmetros analisados, com exceção do atributo textura, tendo este também uma maior intenção de compra. Como o efeito protetor da microencapsulação foi evidente, por permitir o aumento da viabilidade nos produtos finais, uma vez que estavam presentes no período de armazenamento, os resultados mostraram que é possível a incorporação de *Bifidobacterium BB-12* em embutido cárneo tipo salame e ainda obter bons resultados tecnológicos e sensoriais.

**Palavras chave:** Probióticos, Encapsulação, Bifidobactérias, Produto Cárneo

# **APPLICATION AND VIABILITY OF PROBIOTIC (*BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS SUBSP. LACTIS*) MICROENCAPSULATED IN FERMENTED SAUSAGE**

**AUTHOR: BRENDA DE OLIVEIRA GOMES**

**SUPERVISOR: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ANDRESA CARLA FEIHRMANN**

**COSUPERVISOR: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. RAQUEL GUTTIERRES GOMES**

Master Thesis, Food Engineering Graduate Program, State University of Maringá, Av. Colombo, 5790, BL 13 – 07, CEP: 87020-900 – Maringá – PR, Brazil, presented on 27th February 2020.

## **Abstract**

Fermented sausages, are defined as a mixture of thin meat and fat, healing salts, sugars, spices, involved in wraps and subjected to the fermentation and drying. The application of probiotic microorganisms is promising for this type of product, since they do not undergo heat treatment during processing, not affecting the viability of the added microorganisms. However, due to the sensitivity of microorganisms to the challenging conditions of this type of product, microencapsulation has been used to protect itself. In this study a fermented meat product like Salami was developed, added with probiotic microcapsules, where the viability and structure of the microcapsules were evaluated, as well as the effects on the physical-chemical, microbiological and sensory characteristics. Three formulations with different amounts of curing salt, B1 - with 0.02% and 0.7% addition of BB-12, B2 - with 0.01% of curing salt and addition of 0.7% BB-12 and a control (C) with 0.02% of curing salt and without probiotic, were elaborated. During the fermentation and maturation period (12 days) until the end of storage (28 days), physical-chemical (pH, water activity, lipid oxidation and instrumental color), microbiological (fecal coliforms at 35 °C and 45 °C, and Salmonella) and sensory analyses of salami were performed. The addition of microcapsules containing BB-12 did not affect the physicochemical characteristics of salami, the results being within the expected for this type of product. However, the salamis of the B2 treatment (0.02% of curing salts), obtained better sensory acceptance, with notes close to 7, for all parameters analyzed, with the exception of the attribute texture, also having a greater intention of purchase. As the protective effect of microencapsulation was evident, as it allowed the increase of viability in the final products, once they were present in the storage period, the results showed that it is possible to incorporate Bifidobacterium BB-12 in salami type meat embedding and still obtain good technological and sensory results.

**Keywords:** Probiotics, Encapsulation, Bifidobacteria, Meat Product

## SUMÁRIO

<b>1 CAPÍTULO - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 OBJETIVOS</b> .....	<b>2</b>
1.1.1 Geral.....	2
1.1.2 Específicos .....	2
<b>2 CAPÍTULO - REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1 Embutido cárneo</b> .....	<b>2</b>
<b>2.2 Salame</b> .....	<b>3</b>
<b>2.4 Padrões de Identidade e qualidade</b> .....	<b>4</b>
2.4.1 <i>Padrões físico-químicos</i> .....	4
2.4.2 <i>Padrões microbiológicos</i> .....	5
<b>2.5 Microrganismos Probiótico</b> .....	<b>5</b>
2.5.1 <i>Bifidobacterium animalis subp. lactis (BB-12®)</i> .....	6
2.5.2 <i>Microrganismos probióticos em embutidos fermentados</i> .....	7
<b>2.6 Microencapsulação</b> .....	<b>8</b>
2.6.1 <i>Métodos de Encapsulação</i> .....	9
2.6.2 <i>Secagem por atomização (Spray dryer)</i> .....	10
<b>2.7 Microencapsulação de probióticos</b> .....	<b>11</b>
2.7.1 <i>Aplicação de probióticos microencapsulados em salame</i> .....	12
2.8. REFERÊNCIAS .....	12
<b>3 CAPÍTULO - ARTIGO</b> .....	<b>20</b>

## 1 CAPÍTULO - INTRODUÇÃO

A busca por alimentos que contribuam com a manutenção da saúde e bemestar são uma das principais tendências na indústria de alimentos. Conseqüentemente, os fabricantes estão constantemente à procura de novas maneiras de incorporar ingredientes naturais e inovadores, como probióticos, em produtos alimentícios, visando obter alimentos com maiores benefícios para a saúde (RUIZ et al., 2014).

Com o intuito de atender essa necessidade, o uso de probióticos se tornou uma opção. Os probióticos são definidos segundo a Legislação Brasileira, como microrganismo vivo que quando administrado em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do indivíduo (BRASIL, 2018).

As Bifidobactérias são bactérias Gram-positivas, em forma de bastonete, catalase negativa, não formadoras de esporos, sem motilidade e anaeróbias, produtoras de ácido lático (SONG et al., 2018). O consumo de *Bifidobacterium* em produtos processados podem trazer uma melhoria nas condições de saúde por poder agir na melhoria da utilização da lactose, especialmente para indivíduos intolerantes, efeito hipocolesterolêmico, desconjugação de ácidos biliares, inativação de compostos tóxicos e ainda, alívio de sintomas gastrointestinais, entre outros benefícios (BARBOSA et al., 2012).

Na indústria da carne, o uso de probióticos mostra-se mais promissor para produtos fermentados, como o salame, que é o resultado de vários fatores que atuam em sinergia para produzir características específicas durante o amadurecimento, geralmente processados e consumidos sem aquecimento (SIDIRA et al., 2016, RUIZ et al., 2014). No entanto, as células probióticas devem resistir às condições desafiadoras deste tipo de produto (baixos níveis de pH e atividade de água, agentes de cura e organismos e espécies competitivos) e condições gástricas no sistema intestinal humano (PRISCO E MAURIELLO, 2016, MUTHUKUMARASAMY E HOLLEY, 2007).

Desta forma, a fim de proteger os microrganismos probióticos contra tais ambientes adversos do trato gastrointestinal e alimento, as técnicas de microencapsulação podem ser uma alternativa utilizada para a produção de produtos probióticos. A técnica consiste em empacotar células em pequenas cápsulas usando materiais de revestimento que proporcionam às células microbianas uma barreira física (CHAVARRI et al., 2010).

Se tem conhecimento de alguns estudos com a incorporação de bifidobactérias em alimentos, entretanto, não se tem o conhecimento da aplicação de *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* (BB-12) em embutidos cárneos como o salame. Assim, considerando os

benefícios a saúde que a BB-12 traz, a obtenção de microcápsulas deste probiótico e aplicação deste em um alimento com ambiente adverso, mantendo a sua viabilidade, sem alterar as características sensoriais e físico-químicas, pode viabilizar a obtenção de um produto mais saudável, bem como a aplicação deste probiótico microencapsulado em diferentes alimentos.

## **1.1 Objetivos**

### *1.1.1 Objetivo Geral*

Desenvolver produto cárneo fermentado tipo Salame, adicionado do probiótico microencapsulado e avaliar a viabilidade e as características de qualidade durante 28 dias.

### *1.1.2 Objetivo Específico*

- Elaborar microcápsulas contendo microrganismo probiótico, utilizando técnica de secagem em spray dryer,

- Avaliar a viabilidade do microrganismo probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12®) microencapsulado aplicado em salames durante 28 dias

- Avaliar a forma e distribuição do probiótico microencapsulado mediante microscopia eletrônica de varredura (MEV),

- Acompanhar as variações de pH, Atividade de água, Perda de peso, Cor e Oxidação lipídica,

- Acompanhar a estabilidade microbiológica do salame ao final do processo de fermentação e secagem, - Avaliar sensorialmente o salame após 12 dias.

## **2. CAPÍTULO - REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Embutido cárneo**

A industrialização de carne deu origem a uma nova opção de aproveitamento dos cortes menos nobres trazendo, assim, considerável aumento nos ganhos dos abatedouros. Neste contexto, houve uma grande diversificação dos produtos cárneos como almôndegas, hambúrgueres, empanados, linguiças, mortadelas e salames (COSTA, 2004).

Os embutidos são os produtos cárneos elaborados com carne ou com órgãos comestíveis, curados ou não, condimentados, com variações nos tipos de condimentos e

quantidade de sal, cozidos ou não, defumados e dessecados ou não, tendo como envoltório a tripa, a bexiga ou outra membrana animal (BRASIL, 2017). Segundo Benevides e Nassu (2017), existem diversos tipos de embutidos podendo ser curados, fermentados, cozidos, emulsionados e com diferentes teores de umidade, muitos podem ainda se classificar em mais de um desses princípios.

A fermentação em produtos cárneos é um processo caracterizado por alterações contínuas que podem ser bioquímicas, biofísicas e microbiológicas, por meio da ação de enzimas que são secretadas pela microflora natural presente na carne, conferindo as mesmas características organolépticas e nutricionais que não seriam obtidas através de outras formas de processamento. Essa é uma técnica usada há muitos anos para a conservação, e tem-se tentado conhecer, monitorar e melhorar o processo, buscando a obtenção de produtos de qualidade superior (CARVALHO, 2010; CHAVES, 2013; MACEDO, 2005).

O processo fermentativo causa uma redução do pH inicial da mistura cárnea, devido à multiplicação das culturas iniciadoras, que tem a capacidade de produzir ácido lático através da fermentação dos carboidratos, acidificando o meio em que se encontram, em valores de 5.3 (BRASIL, 2000, RAMIREZ et al., 2013). O ácido lático produzido também confere ao alimento sabor picante, desnatura proteínas, conferindo ao mesmo textura e sabor típico dos produtos fermentados (SANTA et al., 2014)

## **2.2 Salame**

De acordo com a legislação Brasileira, o salame é um produto cárneo obtido de carne suína ou suína e bovina, adicionado de toucinho e outros ingredientes, embutido em envoltórios naturais e/ou artificiais, curado, fermentado, maturado e 4 dessecado, e que podem ou não ser submetido à defumação. Esta legislação ainda define oito tipos de salames, sendo eles: tipo italiano, tipo milano, tipo hamburguês, tipo calabrês, tipo friolano, tipo alemão, tipo napolitano e salaminho, que se diferenciam pela matéria-prima utilizada, granulometria da carne e toucinho, e na condimentação (BRASIL, 2000).

Na fabricação deste embutido se faz uso da mais antiga tecnologia de conservação de carnes, a fermentação, onde ocorre a diminuição do pH associada com decréscimo da atividade de água obtida pelo processo de desidratação (BIASI, 2010).

A fabricação do salame envolve três etapas distintas de processo: I) etapa inicial, a elaboração do salame, que ocorre através da cominuição, mistura de ingredientes e embutimento, II) fermentação com acidificação e desenvolvimento de características sensoriais e de cor, e a III) desidratação e secagem do embutido, esta etapa final é importante

por contribuir para a segurança, já que ocorre uma redução da atividade de água, e para o perfil sensorial do produto (TERRA, 2003; HUTKINS, 2006 apud FELDMANN, 2015).

Na fase de fermentação tem-se o início do processo de acidificação, que gera uma redução do pH, até valores próximos de 5,3, e que contribui para a desnaturação e geleificação das proteínas, causando a liberação da água de forma rápida e uniforme. Na fermentação ocorre também a formação da cor, através da formação do pigmento nitrosomioglobina, resultado da reação que ocorre entre a mioglobina e o óxido nítrico gerado da redução do nitrito presente na carne (HOLCK et al., 2011; FARIA et al., 2001). Segundo Leroy et al. (2006), nesta etapa as proteases da carne são responsáveis pela proteólise e formação de peptídeos, importantes na formação de aroma e sabor.

A fase de maturação tem como objetivo proporcionar a secagem para que se desenvolva as qualidades sensoriais (cor, sabor, aroma e textura) e ocorra a inibição de microrganismos patogênicos e deterioradores, aumentando a vida de prateleira do produto (BUCKENHÜSKES, 1993; CASABURI et al., 2007). Nesta fase, os salames devem atingir  $A_w \leq 0,9$  e umidade em torno de 25-40%, para proporcionar a textura característica do produto (HOLCK et al., 2011; KIM et al., 2012).

Segundo Garcia et al., (2000) na etapa de secagem os embutidos podem perder de 30 a 40% de seu peso inicial, que deve ocorrer de forma gradual para evitar a formação de rugosidade, ressecamento excessivo da casca e desprendimento da tripa.

## 2.3 Padrões de Identidade e qualidade

### 2.3.1 Padrões físico-químicos

A Instrução Normativa nº 22 / 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA), alterada pela Instrução Normativa nº 55 de 07 de julho de 2003, fixa a identidade e estabelece as características mínimas de qualidade para os diferentes tipos de salames elaborados no Brasil (Tabela 1).

Tabela 1. Características estabelecidas para produtos denominados “salame tipo Italiano”

Parâmetros	Salame Tipo Italiano
Atividade de água ( $A_w$ )	Máximo 0,90
Umidade	Máximo 40%
Gordura	Máximo 35%
Proteína	Mínimo 20%

Fonte: BRASIL, 2003.

### 2.3.2 Padrões microbiológicos

Os padrões microbiológicos do salame são regulamentados através da RDC nº 12 / 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Na Tabela 2, estão mencionados os microrganismos e o limite de contagem permitido pela Legislação Brasileira para salame.

Tabela 2. Padrão microbiológico para salames

Microrganismo	Tolerância (UFC/g)
Coliformes a 45°C	10 <sup>3</sup>
Staphylococcus coagulase positiva	5 x 10 <sup>3</sup>
Salmonella spp	Ausência/25g

Fonte: BRASIL, 2001.

### 2.4 Microrganismos Probióticos

Os probióticos, são definidos como microrganismos vivos, que quando administrados em doses adequadas, a fim de conferir benefícios à saúde do indivíduo (FAO/WHO, 2002; HILL et al., 2014; Brasil, 2018).

Em 2008 a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) estabeleceu a quantidade mínima de 8 – 9 log UFC/g, no entanto, a partir da atualização das alegações de propriedades funcionais e probióticas no ano de 2016 ficou estabelecido a apresentação de laudo de análise que comprovem a quantidade mínima viável de microrganismo para definir a função probiótica ao final do prazo de validade do alimento (BRASIL, 2016; BRASIL, 2008).

Atualmente, a Legislação Brasileira anunciou que a alegação do alimento probiótico deve estar vinculada a evidências científicas consistentes, por meio da caracterização e identificação clara da linhagem do microrganismo, por meio da apresentação de documentos técnicos ou estudos científicos. Nos produtos adicionados de probióticos, o benefício deve ser comunicado por meio da apresentação de propriedade funcional ou de saúde, através de estudos clínicos documentados (BRASIL, 2018)

Os microrganismos probióticos mais utilizados em alimentos são as cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (SOLANKI et al., 2013; BIS-SOUZA et al., 2019) e outros gêneros como *Enterococcus*, *Saccharomyces* e *Pediococcus*.

#### 2.4.1 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12®)

As bactérias do gênero *Bifidobacterium* são bastonetes anaeróbios, Grampositivas, não formam esporos e não apresentam mobilidade. São heterofermentativas produzindo ácido acético e lático, e não formando gás carbônico. O pH ótimo de crescimento está entre 6,0 e 7,0. A temperatura ótima de crescimento está entre 37 e 41 °C, com máximo entre 43 e 45 °C e praticamente sem crescimento abaixo de 25 e 28 °C (ROY, 2005; MACEDO et al., 2008).

A BB-12® é uma bactéria de catalase-negativa em forma de haste, isolada no banco de células da empresa Chr. Hansen em 1983. Técnicas de classificação molecular moderna reclassificaram a BB-12® como *Bifidobacterium animalis* e também subespécie *lactis*. Hoje, a BB-12® é classificado como *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Sendo somente uma mudança da nomenclatura ao longo dos anos, sem alteração na estirpe (GARRIGUES et al., 2010, JUNGENSEN et al., 2014).

Este gênero de microrganismo probiótico pode trazer benefícios quando ingeridos regularmente no controle de infecções intestinais, atividade anticarcinogênica e ativação do sistema imune, melhoria das condições gerais de saúde após o consumo de produtos contendo *Bifidobacterium*, melhoria na utilização da lactose, especialmente para indivíduos intolerantes, efeito hipocolesterolêmico, desconjugação de ácidos biliares, inativação de compostos tóxicos e ainda, alívio de sintomas gastrointestinais em mulheres com síndrome pré-menstrual (BARBOSA et al., 2012).

#### 2.4.2 *Microrganismos probióticos em embutidos fermentados*

Ebutidos crus, curados e fermentados, como o salame, são bastante consumidos atualmente por se encaixar perfeitamente nas tendências de consumo de produtos com apelo de facilidade de preparo, já que os mesmos estão prontos para consumo, possui facilidade de conservação, versatilidade de uso, podendo ser utilizado individualmente ou como acompanhamento em preparações culinárias, considerável valor nutritivo, variadas formas de apresentação e sabor (MONFORT, 2002).

No entanto, segundo Carvalho et al. (2017) os produtos à base de carne têm sido geralmente relacionados com problemas de saúde como o desenvolvimento de doenças cardiovasculares secundárias e aumento de pressão arterial por seu alto teor de sódio. Por outro lado, a carne e os produtos, à base de carne são um grupo importante de alimentos altamente nutritivos.

Os produtos à base de carne são uma fonte importante de uma vasta gama de nutrientes e contribuem com uma proporção considerável da ingestão de vários nutrientes que são essenciais para um bom crescimento e desenvolvimento, além de fazer parte da dieta de muitos consumidores em todo o mundo. Nos últimos anos, foram feitos grandes esforços para desenvolver alimentos funcionais à base de carne, utilizando estratégias relacionadas com o aumento da presença de compostos benéficos e a limitação dos que têm implicações negativas para a saúde (OLMEDILLA-ALONSO et al., 2013).

Em produtos cárneos a aplicação de microrganismos probióticos depende da capacidade de resistirem ao ambiente desafiador estabelecido durante a fabricação e que podem apresentar baixos valores de pH e de atividade de água, além de sais de cura, especiarias e microrganismos competidores (TRIPATHI & GIRI, 2014).

As bactérias probióticas utilizadas em escala industrial e de processamento devem ser apropriadas para cada tipo de produto e apresentar boa viabilidade, comprovação da eficácia terapêutica, além de permanecer em um número elevado durante a vida de prateleira do produto, a fim de garantir que o número de microrganismos probióticos chegue vivo ao trato intestinal e produzam os efeitos benéficos ao organismo humano (SANDERS et al., 2003; STANTON et al., 2005).

Desta forma, com o objetivo de solucionar estas limitações vem se buscando novas estratégias para a manutenção da viabilidade da aplicação de microrganismos probióticos, dentre elas, está a utilização de tecnologias de microencapsulação para a proteção dos microrganismos (RAJAM & ANANDAN RAMAKRISHNAN, 2015).

## **2.5 Microencapsulação**

A microencapsulação é um processo no qual os agentes ativos (sólidos, líquidos ou gases) são cobertos ou revestidos por material transportador para formar partículas ou cápsulas em escala micrométrica ou nanométrica, reduzindo assim a lesão celular ou a perda celular, de uma maneira que resulta na liberação controlada do microrganismo. Os materiais revestidos (agente ativo) são também designados como núcleo, enchimento ou fase interna, enquanto os materiais de revestimento (material transportador) são conhecidos como material de parede, membrana, cápsula, casca, matriz ou fase externa (DEVI et al., 2017, TYAGI et al., 2011).

A classificação das microcápsulas pode ser feita pelo seu tamanho e morfologia, onde com tamanho inferior a 1 mm são consideradas nanocápsulas, entre 3 a 800 mm são microcápsulas e maiores de 1000 mm macropartículas (PAULO & SANTOS, 2017).

Quanto a morfologia as microcápsulas podem exibir diferenças, sendo dependentes das propriedades do núcleo, material da parede e técnica de microencapsulação. Os principais tipos de microcápsulas que podem ser formadas (Fig. 1) são com sistemas de paredes múltiplas e parede única, com um ou vários núcleos, com o núcleo preso dentro da cápsula ou dentro da parede, e com forma esférica ou irregular (CORRÊA-FILHO, 2019).

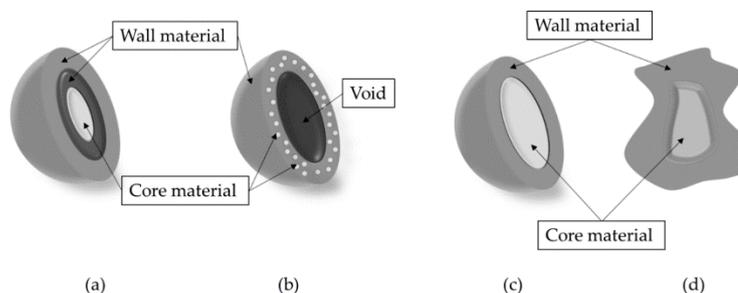


Figura 1. Morfologias das microcápsulas. (a) Multi-parede com núcleo único, (b) Parede simples com multi-core, (c) Parede simples com núcleo único, (d) Forma irregular com um único núcleo e parede.

Fonte: (CORRÊA-FILHO, 2019)

A escolha do agente encapsulante depende de uma série de fatores, entre eles: o mecanismo de liberação do material encapsulado, a não reatividade com o material a ser encapsulado, o método para a formação da microcápsula, propriedades reológicas, habilidade de dispersar ou emulsificar, capacidade de proteção do material a ser encapsulado contra condições desfavoráveis, e ser economicamente viável (DESAI & PARK, 2005).

Segundo Nogueira (2002), um mesmo encapsulante pode não englobar todas essas propriedades, assim, é comum o uso de combinações com mais de um material de cobertura para a obtenção dos resultados desejados. No presente estudo se realizou a combinação de agentes, fazendo uso da  $\beta$ -ciclodextrina, goma xantana e alginato.

A  $\beta$ -ciclodextrina são oligossacarídeos cíclicos, obtidos a partir de degradação enzimática do amido. Como agente encapsulante, tem sido bastante utilizada por sua cavidade apolar e capacidade de gerar complexos de inclusão com uma grande variedade de substâncias orgânicas (VEIGA et al., 2006; WANG et al. 2011).

A goma xantana é um polissacarídeo sintetizado por uma bactéria fitopatogênica do gênero *Xanthomonas* (FONTANIELLA et al., 2002). A principal propriedade das gomas é a capacidade de se ligar com água, apresentando solubilidade tanto em água fria quanto em água quente, fazendo dos carboidratos os materiais mais utilizados para encapsulação. São

altamente pseudoplásticas e a viscosidade é muito estável em relação a amplas faixas de pH e temperatura (DZIEZAK, 1988; SWORN, 2000)

Entre as substâncias utilizadas o alginato de sódio destaca-se por ser o polímero mais utilizado na microencapsulação de células bacterianas, é um polissacarídeo linear solúvel em água, extraído de diferentes tipos algas (MARTÍN et al., 2015; TRABELSI et al., 2013). Possui uma formação rápida do gel na presença de íons cálcio, sem alterações drásticas de temperatura, pH e pressão osmótica, conserva atividade e a viabilidade dos microorganismos microencapsulados (CARVALHO et al., 2006).

### *2.5.1 Métodos de Encapsulação*

O método mais adequado a ser utilizado depende do tipo do material ativo, da aplicação que será dada a microcápsula, das propriedades químicas e físicas do núcleo e da parede, da escala de produção e do custo, do tamanho das partículas requeridas e do mecanismo de liberação desejado para a sua ação (SUAVE et al., 2006; VASISHT, 2014).

Existem inúmeros métodos utilizados para a formação de micropartículas que, em geral, podem ser divididos em três grupos: métodos físicos, métodos químicos e métodos físico-químicos (SOHAIL et al., 2011). Dentre os métodos físicos é possível citar a técnica de atomização ou spray dryer e liofilização. No caso dos métodos químicos as técnicas mais utilizadas são as de emulsão ou polimerização interfacial, inclusão molecular e co-cristalização. Em se tratando de métodos físico-químicos, incluem-se a coacervação, gelificação iônica, extrusão e envolvimento lipossômico (HUERTAS, 2010).

### *2.5.2 Secagem por atomização (Spray dryer)*

No presente estudo optou-se por utilizar a secagem por atomização, por ser uma das mais antigas técnicas utilizadas para a produção de micropartículas, onde são obtidos produtos desidratados na forma de pós finos. Essa técnica tem sido bastante utilizada na indústria de alimentos devido ao baixo custo de produção, simplicidade de execução, facilidade de expansão e capacidade de produzir micropartículas com boas propriedades. Além disso, a remoção de água através da secagem por atomização garante a qualidade microbiológica e facilita o transporte, a dosagem e o armazenamento dos produtos obtidos (PELLICER et al., 2018; ENCINA 2016).

A microencapsulação por spray dryer envolve três etapas: (1) homogeneização do líquido de alimentação por um atomizador, (2) secagem da solução de alimentação por um

gás quente para atingir a evaporação do solvente e (3) coleta de partículas secas por ciclones ou um filtro (Figura 2) (SCHAFROTH et al., 2012).

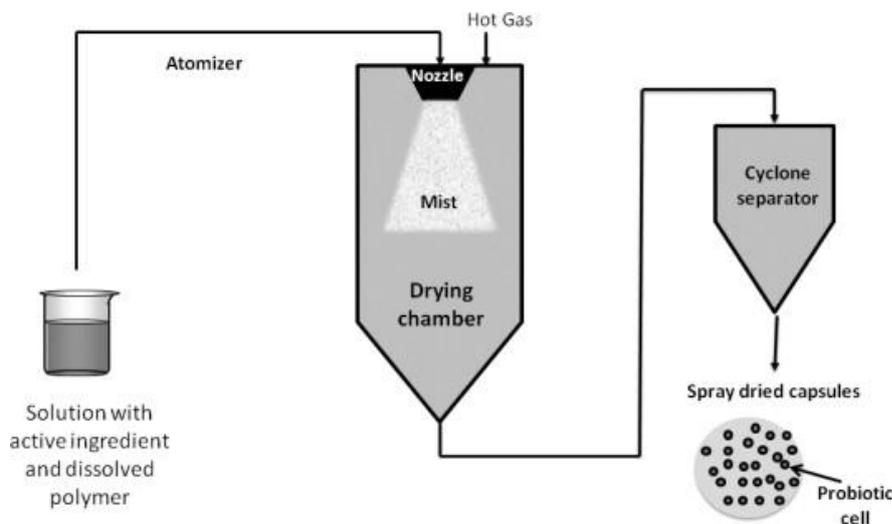


Figura 2. Apresentação esquemática do procedimento de secagem por pulverização.

Fonte: (BURGAIN *et al.*, 2011)

Segundo Pérez-Alonso et al., (2003), os agentes encapsulantes utilizados no método de spray dryer devem possuir alta solubilidade em água, baixa viscosidade a altas concentrações e serem emulsionantes eficientes. Devido à sua versatilidade e ao pequeno tempo de residência dos produtos na câmara de secagem, o uso de spray dryer tornou-se um importante método para a microencapsulação de materiais que apresentam sensibilidade ao calor, como os microrganismos probióticos (ROKKA & RANTAMÄKI, 2010).

## 2.6 Microencapsulação de Probióticos e Aplicação

A microencapsulação de bactérias probióticas leva à proteção celular contra condições desfavoráveis como índices elevados de pH, altas temperatura e umidade, bem como ao longo do trato gastrointestinal (ZHANG et al., 2015). As tecnologias de microencapsulação permitem o desenvolvimento de produtos probióticos mais estáveis com a preservação da viabilidade dos microrganismos durante o processamento, distribuição e armazenamento, prevenindo alterações sensoriais, e durante o processo digestivo (AMINE et al., 2014; FAVARO-TRINDADE et al., 2011; COOK et al., 2012; FAREEZ et al., 2015).

Estudos demonstram a viabilidade na aplicação de probióticos microencapsulados em leites fermentados (RIBEIRO et al., 2014), queijos (ÖZER et al., 2009), sorvetes (CHAMPAGNE et al., 2015), fórmulas infantis (KENT & DOHERTY, 2014), produtos cárneos (WANG et al., 2015), sucos de frutas (DIAS et al., 2018), indicando que esta técnica pode proteger estes microrganismos de condições adversas, mantendo maior estabilidade

durante o processamento, armazenamento e, inclusive, durante a passagem pelo trato digestório (VANISKI, 2017, WANG et al., 2015).

### 2.6.1 Aplicação de microcápsulas probióticas em salame

A possibilidade de obter produtos probióticos em embutidos cárneos fermentados tem sido discutida, não só pelo aumento no interesse por uma alimentação saudável e a busca por alimentos com apelo funcional, mais pelo fato dos produtos fermentados não passarem por um tratamento térmico, o que é um ponto interessante para a viabilidade dos microrganismos (CAVALHEIRO et al., 2015; KOLOZYN-KRAJEWSKA & DOLATOWSKI, 2012; VUYST, FALONY & LEROY; 2008).

Sidira et al. (2014) encapsularam *Lactobacillus casei* ATCC 393 para aplicação em salsichas fermentadas, utilizando-a como cultura starter, mas também com o objetivo de obter um produto probiótico, onde foram detectados ao fim do processo de amadurecimento (66 dias) concentração adequada para considerar o alimento probiótico.

Muthukumarasamy e Holley (2007) obtiveram manutenção satisfatória de *Lactobacillus reuteri* encapsulado em alginato de sódio, aplicado em salames, quando comparado com o microrganismo livre. Song et al. (2018) afirmaram que a adição de 0,02% de cápsulas probióticas em salsichas fermentadas preservou com sucesso, aproximadamente metade da viabilidade das *Bifidobactérias longum*.

## REFERÊNCIAS

AMINE, K. M., CHAMPAGNE, C. P., SALMIERI, S., BRITTEN, M., ST-GELAIS, D., FUSTIER, P. Effect of palmitoylated alginate microencapsulation on viability of *Bifidobacterium longum* during freeze-drying, **Food Science and Technology**, v.56, p.111–117, 2014.

BARBOSA, F. H. F., DA SILVA, A. M., BARBOSA, L. P. J. D. L., NICOLLI, J. R. O gênero *Bifidobacterium*: Dominância á favor da vida. **Ciência Equatorial**, v. 1, n. 2, 2012.

BENEVIDES, S. D., NASSU, R. T., **Produtos cárneos**. Disponível em:<[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/ovinos\\_de\\_corte/arvore/CONT000gizohks02wx5ok0tf2hbweqanedo.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/ovinos_de_corte/arvore/CONT000gizohks02wx5ok0tf2hbweqanedo.html)> Acesso em: 23 de jul. de 2019.

BIS-SOUZA, C. V., OZAKI, M. M., VIDAL, V. A. S, POLLONIO M. A. R, Penna, A. L. B., Barretto, A. C. S. Can dietary fiber improve the technological characteristics and sensory acceptance of low-fat Italian type salami?. **J Food Sci Technol**. v.11, p. 1-10, 2019. doi:10.1007/s13197-019-04133-6

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 241, de 26 de julho de 2018. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa no. 22 de 31 de julho de 2000. **Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos.** Diário Oficial da União, Brasília, 27 de julho de 2018. p. 97.

BRASIL. DECRETO Nº 9.013, DE 29 DE MARÇO DE 2017. **Dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal.** Diário Oficial da União, 30 de março de 2017. p. 3 Disponível em: <[http://www.in.gov.br/materia//asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/20134722/do1-2017-03-30-decreto-n-9-013-de-29-de-marco-de-2017-20134698](http://www.in.gov.br/materia//asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/20134722/do1-2017-03-30-decreto-n-9-013-de-29-de-marco-de-2017-20134698)>. Acesso em: 22 dez 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos Com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde.** 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>> Acesso em: 23 de jul. de 2019

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e, ou, de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos.** Atualizado em Julho de 2008. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)> Acesso em: 23 de jul. de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Aprova o Regulamento Técnico de Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos.** Diário Oficial da República Federativa do BRASIL. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffddf63767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf63767-4527-bfac-740a0400829b)>. Acesso em: 23 de jul. de 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 22, de 31 de julho de 2000. **Aprova o Regulamento Técnico de Identidade de Qualidade de Salames.** Diário Oficial da União, Brasília, 03 agosto. 2000. p. 15-28. Disponível em: <<https://alimentusconsultoria.com.br/wp-content/uploads/2016/09/IN-N%C2%BA-22-DE-31-07-2000.pdf>>. Acesso em: 23 de jul. de 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. **Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.** Diário Oficial da União, Brasília, 18 set. 2003. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/legislacoes-emetodos/poa/copy3\\_of\\_Manualdemtodosoficiaisparaanlisedealimentosdeorigemanimal1ed.rev\\_.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/legislacoes-emetodos/poa/copy3_of_Manualdemtodosoficiaisparaanlisedealimentosdeorigemanimal1ed.rev_.pdf)>. Acesso em: 23 de jul. de 2019.

BUCKENHÜSKES, H. J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, p. 253-272, 1993.

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, ed. 4, p. 467-483, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031>

CAVALHEIRO, C. P., RUIZ-CAPILLAS, C., HERRERO, A. M., JIMÉNEZ-COLMENERO, F., MENEZES, C. R. De, FRIES, L. L. M. Application of probiotic delivery systems in meat products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, n. 1, p. 120-131, 2015.

CARVALHO, L. M. C. P. Q. **Identificação e caracterização de Isolados de Staphylococcus: sua utilização como culturas de arranque em enchidos fermentados secos e fumados**. 2010. 118 f. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, 2010.

CARVALHO, C. C. P., VIDIANY SANTOS A. Q., GOMES R. G., HOFFMANN F. L. Fermented sausage production using *E. faecium* as starter culture: Physicochemical and microbiological profile, sensorial acceptance and cellular viability. **Acta Scientiarum. Technology**, v.39, n.4, p.395-402, 2017. doi: 10.4025/actascitechnol.v39i4.30882

CHAMPAGNE, C. P.; RAYMOND, Y.; GUERTIN, N.; BÉLANGER, G. Effects of storage conditions, microencapsulation and inclusion in chocolate particles on the stability of probiotic bacteria in ice cream. **International Dairy Journal**, v. 47, p. 109-117, 2015.

CHAVARRI, M., MARANON, I., ARES, R., IBANEZ, F.C., MARZO, F., MDEL, C.V. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, p. 185-189, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.022>

CHAVES, A. A. M. **Avaliação da suscetibilidade a antibióticos de Lactobacillus plantarum isolados de produtos de salsicharia tradicional portuguesa**. 2013. 74 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal. 2013

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. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.003>

COSTA, L. O. **Processamento e Diminuição do Reprocesso do Hambúrguer Bovino (HBV)**. 2004. 127 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos). Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2004.

DESAI, K. G. H., PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, p.1361-1394, 2005. <https://doi.org/10.1081/DRT-200063478>

DEVI, N., SARMAH, M., KHATUN, B., MAJI, T. K. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 239, p. 136-145, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.05.009>

DIAS, C. O., ALMEIDA, J. S. O., PINTO, S. S., SANTANA, F. C. O., VERRUCK, S., OLIVERA, C. M., PRUDÊNCIO, M. S., AMBONI, R. D. M. C. Development and physico-chemical characterization of microencapsulated bifidobacteria in passion fruit juice: A functional non-dairy product for probiotic delivery. **Food Bioscience**, v. 24, p. 26-36, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.05.006>

ENCINA, C., VERGARA, C., GIMÉNEZ, B., OYARZÚN-AMPUERO, F., ROBERT, P. Conventional spray-drying and future trends for the microencapsulation of fish oil. **Trends in Food Science & Technology**, v. 56, p. 46–60, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.014>

FAO/WHO, JOINT. Food and Agriculture Organization of the United States/World Health Organization. Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London, Ontario, Canada, 30 April - 1 May. 2002.

FAREEZ, I. M., LIM, S. M., MISHRA, R. K., RAMASAMY, K. Chitosan coated alginate-xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* Lab12. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1419-1428, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.054>

FARIA, J. de A. F., FELÍCIO, P. E., NEVES, M. A., ROMANO, M. A. Formação e Estabilidade da Cor de Produtos Cárneos Curados. **Tecnocarne Digital**, v.3, n.2, p.16-22, 2001.

FAVARO-TRINDADE, C. S., HEINEMANN, R. J. B., PEDROSO, D. L. Developments in probiotic encapsulation. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 6. p. 1-8, 2011. DOI: doi10.1079 / PAVSNNR20116004

FELDMANN V. **Avaliação de linhagens bacterianas obtidas a partir do kefir como cultura iniciadora para produção de embutido cárneo fermentado**. 112p. Dissertação ( Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

GARCIA, F. T., GAGLEAZZI, U. A., SOBRAL, P. J. A. Variação das propriedades físicas e químicas do salame tipo italiano durante secagem e fermentação. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, n. 48, p. 151-158, 2000.

GARRIGUES, C., OHANSEN, E. J., PEDERSEN, M. B. Complete Genome Sequence of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, a Widely Consumed Probiotic Strain, **Journal of Bacteriology**, v. 192, p. 2467-2468, 2010. DOI: 10.1128 / JB.00109-10

HILL, C., Guarner F., Reid G., Gibson G. R., Merenstein, D. J., Pot B., Morelli L., Canani R.B., Flint, H. J., Salminen S., Calder P. C. & Sanders M. E. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506-14, 2014. doi: 10.1038 / nrgastro.2014.66

HOLCK, A. L., AXELSSON, L., RODE, T. M., HØY, M., MÅGE, I., ALVSEIKE, O., L'ABÉE-LUND, T. M., OMER, M. K., GRANUM, P. E., HEIR, E. Reduction of verotoxigenic *Escherichia coli* in production of fermented sausages. **Meat Science**, v.89, p.286–295, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.031>

HUERTAS R. A. P. Revisión: Microencapsulación de Alimentos. **Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín**, v. 63, n. 2, p. 5669-5684, 2010.

HUTKINS, R.W. Micrororganisms and Melabolism. In: \_\_\_\_\_. **Microbiology and technology of fermented foods**. 1st ed. Ames: Blackwell Publishing, 2006. p. 15-66a.

JUNGERSEN, M., WIND, A., JOHANSEN, E., CHRISTENSEN, J. E., STUER-LAURIDSEN, B., ESKESEN, D. The Science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®. **Microorganisms**, v. 2, n. 2, p. 92-110, 2014. doi: 10.3390/microorganisms2020092

KENT, R. M.; DOHERTY, S. B. Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. **Food Research International**, v. 64, p. 567-576, 2014.

KIM, I. S., JO, C., LEE, K. H., AHN, D. U., KANG, S. N. Effects of low-level gamma irradiation on the characteristics of fermented pork sausage during storage. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, p. 466-472, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2011.12.037>

LEROY, F., VERLUYTEN, J., VUYST, L. D. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p. 270-285, 2006. doi:10.1016 / j.ijfoodmicro.2005.06.027

MACEDO, R. E. F., PFLANZER, S. B., TERRA, N. N., FREITAS, R. J. S. Desenvolvimento de embutido fermentado por *Lactobacillus* probióticos: características de qualidade. **Ciencia e tecnologia de alimentos**, v.28, n.3, p. 509-519, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000300002>

MACEDO, R. E. F. **Utilização de culturas lácticas probióticas no processamento de produto cárneo fermentado**. 198 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 4, de 31/03/2000, que aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Linguiça e de Salsicha**. Diário Oficial da União, 05 de abril de 2000.

MONFORT, J. M. Los productos carnicos crudos curados. In: XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (2002: Porto Alegre). **Anais**. Porto Alegre: SBCTA, 2002. p. 3984-3992.

MUTHUKUMARASAMY, P., HOLLEY, R. A. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry fermented sausages containing micro-encapsulated probiotic lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 82-88, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.03.004>

NOGUEIRA, R. I. **Processo de obtenção de inulina de chicória (*Cichorium intybus*) em pó**. 104p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2002.

OLMEDILLA-ALONSO, B., JIMÉNEZ-COLMENERO, F., SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. **Meat Science**, v.95, n.4, p.919-930, (2013). doi: 10.1016/j.meatsci.2013.03.030

ÖZER, B., KIRMACI, H. A., ŞENEL, E., ATAMER, M., HAYALOĞLU, A. Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* Bb-12 and *Lactobacillus acidophilus* La-5 in white-brined cheese by microencapsulation. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 1, p. 22-29, 2009.

PAULO, F., SANTO S. L. Design of experiments for microencapsulation applications: A review. **Materials Science & Engineering: C**, v. 77, n. 1, p. 1327-1340, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.219>

PELLICER, J.A., FORTEA, M.I., TRABAL, J., RODRÍGUEZ-LÓPEZ, M.I., CARAZO-DÍAZ, C., GABALDÓN, J.A., NÚÑEZ-DELICADO, E. Optimization of the microencapsulation of synthetic strawberry flavor with different blends of encapsulating agents using spray drying. **Powder Technol**, v. 338, p. 591–598, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.07.080>

PÉREZ-ALONSO, C., BÁEZ-GONZÁLEZ, J., BERISTAIN, C., VERNON-CARTER, E., VIZCARRA-MENDONZA, M. Estimation of the activation energy of carbohydrate polymer blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 2, p. 197-203, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00052-3](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00052-3)

PRISCO, A., MAURIELLO, G. Probiotication of foods: a focus on microencapsulation tool. **Trends in Food Science & Technology**, v.48, p.27-39, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.009>

RAJAM, R., ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation Of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructo oligosaccharide as wall material by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 773-780, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.062>

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

RUIZ, J. N.; VILLANUEVA, N. D. M.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; CONTRERAS-CASTILLO, C.J. **Physicochemical, microbiological and sensory assessments of Italian salami sausages with probiotic potential**. *Scientia Agricola*, v.71, n.3, p.204-21,2014.

ROKKA, S., RANTAMÄKI, P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. **European Food Research and Technology**, v. 231, n. 1, p. 1-12, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1246-2>

ROY, D. Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. In: **International Symposium on Propionibacteria and Bifidobacteria: dairy and probiotic applications**. v. 85, n. 1-2, p. 39-56, 2005. <https://doi.org/10.1051/lait:2004026>

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v. 61, n. 3, p.91-99, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1301/nr.2003.marr.91-99>

SANTA, O. R. D., MACEDO, R. E. F., SANTA, H. S. D., 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. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.6467>

SCHAFROTH N., ARPAGAUS C., JADHAV U.Y., MAKNE S., DOUROUMIS, D. Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray-drying process. **Colloids and Surfaces Biointerfaces**, v. 90, p. 8-151, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.038>

STANTON, C., ROSS, R. P., FITZGERALD, G. F., VAN SINDEREN, D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 196-203, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.008>

SIDIRA, M., GALANIS, A., NIKOLAOU, A., KANELLAKI, M., KOURKOUTAS, Y. Evaluation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 protective effect against spoilage of probiotic dry-fermented sausages. **Food Control**, v. 42, p. 315-320, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.024>

SIDIRA, M., KANDYLIS, P., KANELLAKI, M., & KOURKOUTAS, Y. Effect of curing salts and probiotic cultures on the evolution of flavor compounds in dry-fermented sausages during ripening. **Food Chemistry**, v. 201, p. 334-338, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.084>. PMID:26868585.

SOLANKI, H. K., PAWAR, D. D., DUSHYANT, A. S., PRAJAPATI, V. D., JANI, G. K., MULLA, A. M., THAKAR, P. M. Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. **BioMed Research International**, p. 1–21, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/620719>

SONG, M. Y., HOA, V. B., PARK, W. S., YOO, J. Y., KANG, H. B., KIM, J.H., KANG, S. M., KIM, B. M., OH M. H, HAM J. S. Quality characteristics of functional fermented sausages added with encapsulated probiotic bifidobacterium *longum* KACC 91563. **Korean J. Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 38(5), p. 981-994, 2018. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.e30>

SUAVE, J., DALL'AGNOL, E. C., PEZZIN, A. P. T., SILVA, D. A. K., MEIER, M. M., SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

TERRA, N. N. Particularidades na fabricação do salame. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n. 317, p. 42-44, 2003.

TRIPATHI, M. K., GIRI, S. K. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, n. 1, p. 225-241, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>

TYAGI, V., KAUSHIK S., TYAGI S., AKIYAMA T. Development of phase change materials based microencapsulated technology for buildings: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 1373-1391, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.10.006>

VANISKI, R., CORTI, D., DRUNKLER, D. A. Técnicas e Materiais Empregados na Microencapsulação de Probióticos. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 8, n.1, p. 156-184, jan./mar. 2017. <https://periodicos.utfpr.edu.br/rebrapa>

VASISHT N. Chapter 2 - Factors and Mechanisms in Microencapsulation In **Microencapsulation in the Food Industry**, edited by Anilkumar G. Gaonkar, Niraj Vasisht, Atul Ramesh Khare and Robert Sobel, Academic Press, San Diego, p. 15-24, 2014.

VUYST, L., FALONY, G., LEROY, F. Review: Probiotics in fermented sausages. **Meat Science**, v. 80, p. 75-78, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.05.038>

WANG, Y., SUN, Y., ZHANG, X., ZHANG, Z., SONG, J., GUI, M., LI, P. Bacteriocin-producing probiotics enhance the safety and functionality of sturgeon sausage. **Food Control**, v. 50, p. 729-735, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.09.045>

ZHANG, Y., LIN, J., ZHONG, Q. The increased viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 encapsulated in emulsions with multiple lipid-protein-pectin layers. **Food Research International**, v. 71, p. 9-15, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.02.017>

## **CAPÍTULO 3 – ARTIGO**

### **DESTAQUES**

- A adição de microcápsulas de BB-12 não afetou as características de qualidade.
- A redução de sais de cura provocou uma menor estabilidade das microcápsulas.
- Ambos os tratamentos apresentaram índices adequados de células viáveis ao final do armazenamento.
- Os salames com 0.02% de sais de cura (B2) obtiveram maiores notas de aceitação sensorial.

**Microencapsulação de *Bifidobacterium Animalis* subsp. *Lactis* (BB-12): Aplicação e viabilidade embutido cárneo fermentado tipo salame**

Brenda de Oliveira Gomes<sup>a\*</sup>, Catarina de Mesquita Oliveira<sup>a</sup>, Annecler Rech de Marins<sup>b</sup>, Raquel Guttierrez Gomes<sup>c</sup>, Andresa Carla Feihrmann<sup>c</sup>.

<sup>a</sup> Programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Maringá – CEP: 87020-900 – Maringá – PR – Brasil.

<sup>b</sup> Programa de pós-graduação em Ciência Alimentos – Universidade Estadual de Maringá – Maringá – CEP: 87020-900 – PR – Brasil.

<sup>c</sup> Departamento de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Maringá – Maringá – CEP: 87020-900 – PR – Brasil.

\*Autor Correspondente.

E-mail: brenda.engufma@outlook.com (B. O. Gomes), Telefone: 55 99 99127-5862.

**Conflito de interesse:** Os autores declaram não ter conflito de interesse.

**Agradecimentos:** Os autores agradecem a Fundação Araucaria do Estado do Paraná - pelo financiamento da pesquisa.

## **Microencapsulação de *Bifidobacterium Animalis* subsp. *Lactis* (BB-12): Aplicação e viabilidade embutido cárneo fermentado tipo salame**

### **Resumo**

Neste estudo desenvolveu-se um produto cárneo fermentado tipo Salame, adicionado de microcápsulas probióticas, sendo este avaliando quanto a viabilidade e a estrutura das microcápsulas, bem como os efeitos sobre as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. Três formulações com diferentes quantidades de sal de cura, B1 - com 0.02% e adição de 0.7% de BB-12, B2 - com 0.01% de sal de cura e adição de 0.7% de BB-12 e um controle (C) com 0.02 % de sal de cura e sem probiótico, foram elaboradas. Durante o período de fermentação e maturação (12dias), e ao final do armazenamento (28 dias), foram analisados os parâmetros físico-químicos (pH, atividade de água, índice de oxidação lipídica e cor instrumental), microbiológicos e sensoriais dos salames. A adição de microcápsulas contendo BB-12 não afetaram as características físico-químicas dos salames. Entretanto, os salames do tratamento B2(0,02% de sais de cura), obtiveram melhor aceitação sensorial, com notas próximas de 7, para todos os parâmetros analisados, com exceção do atributo textura, tendo este também uma maior intenção de compra. O efeito protetor da microencapsulação foi evidente, por permitir o aumento da viabilidade nos produtos finais, uma vez que estavam presentes no período de armazenamento, mostrando que é possível a incorporação de *Bifidobacterium* BB-12 em embutido cárneo tipo salame com bons resultados tecnológicos e sensoriais.

**Palavras chave:** Probióticos, Encapsulação, Bifidobactérias, Produto Cárneo

## Introdução

A busca por alimentos que contribuam para saúde e bem-estar são uma das principais tendências na indústria de alimentos. Consequentemente, os fabricantes estão constantemente à procura de novas maneiras de incorporar ingredientes naturais e inovadores, como probióticos, em produtos alimentícios, visando obter alimentos com maiores benefícios a saúde (Ruiz et al. 2014).

A legislação Brasileira define probiótico como microrganismos vivos que, quando administrado em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do indivíduo (Brasil 2018). As Bifidobactérias são bactérias produtoras de ácido lático, bactérias Gram-positivas, em forma de bastonete, catalase negativa, não formadoras de esporos, sem motilidade e anaeróbias (Song et al. 2018).

Na indústria da carne, o uso de probióticos mostra-se mais promissor para produtos fermentados, como o salame, que é o resultado de vários fatores que atuam em sinergia para produzir características específicas durante o amadurecimento, geralmente processados e consumidos sem aquecimento (Sidira et al. 2016, Ruiz et al. 2014).

No entanto, as células probióticas devem resistir às condições desafiadoras deste tipo de produto (baixos níveis de pH e atividade de água, agentes de cura, organismos e espécies competitivas) e ainda as condições gástricas no sistema intestinal humano (Prisco e Mauriello 2016).

Desta forma, a fim de proteger os microrganismos probióticos contra tais ambientes adversos do trato gastrointestinal e do alimento, as técnicas de microencapsulação podem ser uma alternativa para a produção de produtos probióticos. A técnica consiste em empacotar células em pequenas cápsulas usando materiais de revestimento que proporcionam às células microbianas uma barreira física (Chavarri et al. 2010).

Se tem conhecimento de alguns estudos com a incorporação de bifidobactérias em alimentos, entretanto, não se tem o conhecimento até o momento da aplicação de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) em 25 embutidos cárneos como o salame. Assim, o presente estudo busca desenvolver um produto cárneo fermentado tipo Salame, adicionado de microcápsulas probióticas (BB-12), avaliando a viabilidade do probiótico e a estrutura das microcápsulas, bem como, o efeito da incorporação do probiótico sobre características físico-químicas e sensoriais.

## **Material e Métodos**

### **Elaboração das microcápsulas**

Para a elaboração das microcápsulas foram usados o probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* (BB-12®, Chr. Hansen, Honsholm, Dinamarca). A solução encapsulante foi desenvolvida usando, 3.2% de Alginato (Sigma-Alorich®, Brasil), 0.88% de  $\beta$ -ciclodextrina (Dinâmica®, Brasil) e 0.5% de Goma Xantana (Danisco®). Os agentes encapsulantes foram dissolvidos em 930 ml de água peptonada, seguida da esterilização da solução. Ao final da esterilização foram adicionados 7 g de BB-12 a solução estéril.

A microencapsulação do probiótico foi realizada em um mini spray dryer (MSD 1.0 Labmaq, São Paulo, Brasil), operando a temperatura constante de entrada de ar de  $130 \pm 2$  °C e temperatura de saída de  $94 \pm 3$  °C. As soluções de alimentação foram mantidas à temperatura ambiente e alimentadas na câmara principal através de uma bomba peristáltica, com fluxo de alimentação de 0.40 L/h, vazão de ar de secagem de 30 L/min e pressão do ar de secagem de 3 Bar. As microcápsulas foram coletadas da base do ciclone, colocadas em um frasco de vidro estéril com tampa e armazenada em dessecador até a utilização.

### **Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Para avaliação das características morfológicas, foram obtidas micrografias em um microscópio eletrônico de varredura (MEV). Para realização das análises foram utilizadas resoluções micrométricas de 20  $\mu\text{m}$  e voltagens de aceleração de 15 kV. As leituras foram realizadas no equipamento Shimadzu Modelo SS-550 (Super Scanning).

### **Elaboração dos salames**

Foram preparados salames tipo italiano utilizando uma mistura de 50% de carne suína (moída em disco de 8 mm) e 40% de toucinho (moído em disco de 8 mm). As formulações continham cloreto de sódio (3%), açúcar (0.5%), pimenta preta (0.02%), alho (0.3%) e noz moscada (0.02%). Foram desenvolvidas três formulações com diferentes quantidades de sal de cura, B1 com 0.02% e adição de 0.7% de BB12, B2 com 0.01% de sal de cura e adição de 0.7% de BB12 e uma controle C com 0.02 % de sal de cura e sem BB12. A concentração de sais de cura foi definida com base nas formulações tradicionais observadas em diversos estudos com variação máxima de 0,015% - 0,03%.

Os ingredientes foram misturados até a obtenção de uma massa uniforme e em seguida embutida em tripa natural (Contrimar, Maringá) com 30 mm de diâmetro, formando gomos de aproximadamente 70 g com 7 cm. Após o embutimento, os salames foram identificados e maturados em temperatura ( $\pm 20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e umidade ( $\pm 60\%$  a  $70\%$ ) controladas.

A etapa de fermentação e maturação foi encerrada após 12 dias, quando os salames atingiram atividade de água inferior a 0,90 conforme descrito na Legislação Brasileira (Brasil 2000). Ao final do 12º dia, os salames foram armazenados por 16 dias, em temperatura ambiente ( $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para analisar a vida de prateleira dos mesmos, totalizando 28 dias.

## Análises dos Salames

As análises físico químicas de atividade de água ( $A_w$ ), pH, e cor instrumental, foram realizadas em intervalos de dias diferentes durante os 12 dias de maturação (0, 4, 8 e 12 dias) e armazenamento (28 dias). A análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram realizadas nos dias 1 e 12 de maturação e 28 dias de armazenamento. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### *Atividade de água e pH*

A atividade de água ( $A_w$ ) foi determinada a 25 °C utilizando um medidor de atividade de água  $A_w$ - sprint (Novasina TH-500, Switzerland). O pH foi medido em pHmetro portátil de penetração para carnes (Hanna, HI-99163, Romania). A medida foi realizada em três pontos distintos, nas extremidades e no meio, com três leituras para cada tratamento (Bis-Souza et al. 2019)

### *Cor instrumental*

A cor das amostras de salame foi medida usando colorímetro (Konica Minolta, CR-400, Japão), previamente calibrado em uma placa branca. Foram medidos três parâmetros:  $L^*$  (luminosidade),  $a^*$  (intensidade de vermelho) e  $b^*$  (intensidade de amarelo) medidos em três locais das amostras, coletadas da seção transversal dos produtos.

A partir destes resultados foi calculado o Chroma ( $C^*$ ) (Eq. 1), ângulo de tonalidade ou ângulo hue ( $h^*$ ) (Eq. 2) e a diferença de cor ( $\Delta E$ ) das formulações (Eq. 3).

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$h^* = \tan^{-1} \left( \frac{b^*}{a^*} \right) \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\Delta E = \sqrt{[(L_0 - L)^2 + (a_0 - a)^2 + (b_0 - b)^2]} \quad (\text{Eq. 3})$$

Para o cálculo do  $\Delta E$  tem-se que  $L$ ,  $a$  e  $b$  foram os valores medidos no 12º dia, e  $L_0$ ,  $a_0$  e  $b_0$  são os valores iniciais obtidos (dia 0) (Amsa 2012). O resultado foi dado com base na maior diferença entre duas cores: imperceptível ( $\Delta E^* < 1$ ), mínima ( $1 \leq \Delta E^* < 2$ ), apenas

perceptível ( $2 \leq \Delta E^* < 3$ ), perceptível ( $3 \leq \Delta E^* < 5$ ), forte diferença ( $5 \leq \Delta E^* < 12$ ), cor diferente ( $\Delta E^* \geq 12$ ) (Cecchini et al. 2011).

#### *Perda de peso*

Três amostras de salame (com peso inicial de aproximadamente 70 g) de cada tratamento foram inicialmente pesadas. As mesmas amostras foram novamente pesadas nos intervalos pré-determinados (0, 4, 8 e 12 dias), sendo as perdas de peso expressas como porcentagem do peso inicial (Glisic et al. 2019).

#### *Oxidação lipídica*

As análises das substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Raharjo et al. (1992), modificado por Wang et al. (2002), seguindo recomendações de Shahidi e Synomiecki (1985) no que se refere à adição de sulfanilamida para as amostras que contém nitrito, com algumas adaptações. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-vis (Femto, 700plus, São Paulo) a 531 nm. A quantificação foi realizada frente a uma curva padrão ( $1 \times 10^{-8}$  a  $10 \times 10^{-8}$  mol/mL) de solução de dietilacetal (TEP). Os resultados foram expressos em mg de malonaldeído/kg de salame.

#### **Análises microbiológicas**

A análise de viabilidade foi realizada tanto nas microcápsulas quanto nas amostras de salame, sendo esta última realizada nos intervalos 1º, 12º e 28º dia. Ambas foram realizadas por meio de diluições decimais seriadas, inoculadas em meio seletivo (BSM) através de plaqueamento por profundidade, com incubação em anaerobiose (Anaerobac) a 37 °C/48 horas, de acordo com a metodologia do IDF (2007). O resultado foi expresso em  $\log \text{UFCg}^{-1}$  (unidades formadoras de colônias por grama).

Foram realizadas análises de coliformes fecais a 35 °C e a 45 °C ( $\text{UFCg}^{-1}$ ), determinada pelo método do número mais provável (NMP), encubado a 37 °C/48 h (Silva et al. 2007),

análise de Salmonella (UFCg<sup>-1</sup>) cultivada em placas 3M™ Petrifilm™, de acordo com o método oficial de análise (AOAC 2014). Ambas as análises foram realizadas no 12º dia, como medidas do controle de qualidade do produto.

### **Análise sensorial**

A análise sensorial foi realizada com 90 provadores não treinados de ambos os sexos, com faixa etária de 18-50 anos. Os atributos sensoriais avaliados foram cor, aparência, aroma, sabor, textura e impressão global usando uma escala hedônica estruturada mista de 9 pontos, ancorada nos extremos pelos termos “gostei muitíssimo” e “desgostei muitíssimo”. Enquanto a atitude de compra dos provadores foi avaliada, por meio de escala estruturada mista de 5 pontos, ancorada nos extremos pelos termos “certamente compraria” e “certamente não compraria” (Dutcosky 2011).

Os testes foram realizados após o 12º dia de fermentação e maturação das amostras de salame. As amostras foram apresentadas fatiadas (~1 g) em temperatura ambiente (25 °C) em bandejas por meio de blocos inteiramente casualizado, codificadas com algarismos de três dígitos, de forma monádica e sequencial. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Humanos (Copep) da Universidade Estadual de Maringá (Paraná, Brasil) sob o protocolo N° 3.556.884.

### **Análise Estatística**

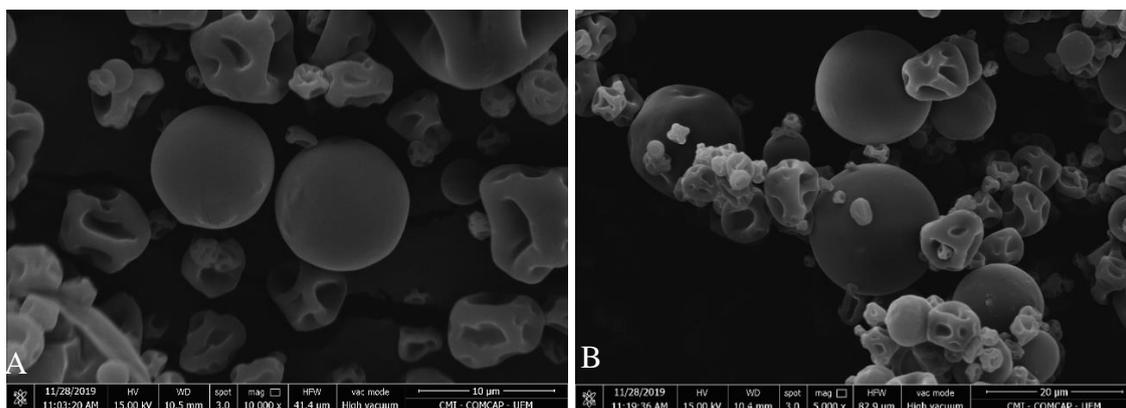
A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, utilizando o software R, versão 1.2.5019 com nível de significância de 5%.

## Resultados e Discussão

### Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Através da microscopia eletrônica foi possível observar a morfologia externa, tamanho das microcápsulas produzidas, e a eficiência da microencapsulação demonstrando a ausência do microrganismo livre confirmando a formação de microcápsulas (Fig. 1).

As microcápsulas contendo BB-12 obtidas através do uso do *spray drier* apresentaram variação em sua forma, tendo algumas formas esférica e concavidades, além de variação nos tamanhos. As superfícies externas exibem paredes livres de fissuras ou rupturas, o que é fundamental para garantir maior proteção e menor permeabilidade.

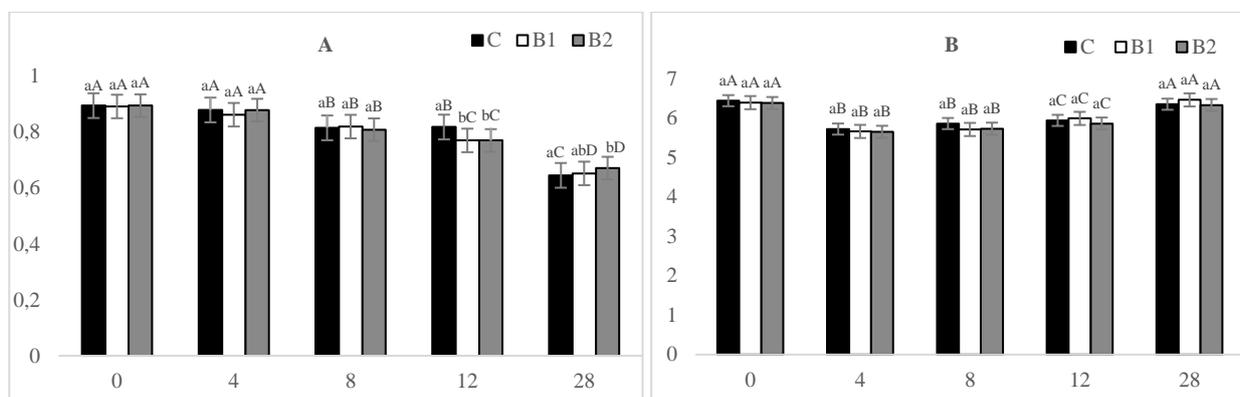


**Fig. 1** Micrografia da microcápsula de *Bifidobacterium* Bb-12 (A-10 000x e B-5 000x)

A formação de concavidades na superfície de partículas atomizadas é uma característica comum neste tipo de produto e podem ser atribuídas ao encolhimento das partículas durante o processo de secagem devido à evaporação rápida das gotas líquidas (Favaro-Trindade et al. 2010). Essas concavidades nas microcápsulas podem ser chamadas de "efeito bola plana" e a extensão a que este efeito ocorre depende do agente encapsulante utilizado e da temperatura de secagem (Lian et al. 2002).

### Atividade de água, pH e Perda de peso

É possível observar (Fig. 2) que houve diferenças significativas ( $P > 0.05$ ) durante o tempo de fermentação, maturação e armazenamento para a atividade da água e pH. Os valores iniciais de atividade de água ( $A_w$ ) apresentaram-se entre 0.895 e 0.820 (Fig. 1a).



**Fig. 2** Atividade de água (A) e pH (B) dos salames (C - 0.020% de sais de cura e sem adição de cultura, B1 - adicionados de 0.7% de cultura + 0.010% de sais de cura, B2 – 0.7% de cultura + 0.020% de sais de cura). Letras minúsculas iguais no mesmo intervalo de tempo, não diferem entre si pelo teste Tukey ( $p < 0.05$ ). Letras maiúsculas iguais para a mesma formulação em momentos diferentes, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Segundo Bis – Souza et al. (2019), ao longo do processo de fermentação e maturação, os salames perdem água por evaporação, o que faz com que a  $A_w$  diminua. No presente estudo essa redução foi observada nos intervalos dos dias (8 – 12) de fermentação e maturação, prolongando-se até 28 dias de armazenamento, nesses períodos ocorrem diferenças significativas ( $P < 0.05$ ) tanto individualmente como quando se compara os tratamentos.

Ao final do período de armazenamento a  $A_w$  das amostras B1 e B2 foi de 0.652 e 0.671, respectivamente, enquanto o controle (C) apresentou valores de 0.645 (Fig. 2a), estando estes, dentro do valor máximo recomendado pela Norma Brasileira que é de 0.90 (Brasil 2000).

O acompanhamento do pH e da  $A_w$  é extremamente importante para acompanhar a estabilidade do produto, uma vez que, a diminuição do pH, que depende exclusivamente da

acidificação causada por bactérias lácticas, e a atividade da água estão relacionados à perda de água do produto para o meio ambiente durante o processo de secagem (Prado et al. 2019).

O pH inicial foi de cerca de 6.4 para todos os salames (Fig. 2b). Após 4 dias é possível observar diferenças significativas ( $P < 0.05$ ), uma vez que, o valor do pH diminuiu para 5.71 a 5.86, chegando ao 12º dia com uma variação de 5.86 a 5.99. Durante o período de armazenamento (12 – 28 dias) o valor de pH aumentou até estabilizar em valores próximos a 6.00. Os valores observados para pH estão dentro da faixa citada por outros autores para salame tais como, Zinardi et al. (2010) e Di Cagno et al. (2008).

A redução do pH em salames pode ser devido a ação das bactérias lácticas sobre os açúcares com conseqüente produção de ácido láctico, que é responsável pelo processo de fermentação, enquanto que, o aumento nas taxas de pH após o 8º dia, é causado por reações de descarboxilação e desaminação de aminoácidos, liberando amônia, tornando o meio mais alcalino (Trzaskowska et al. 2014, Ruiz et al. 2014).

Com relação a perda de peso dos salames, nota-se um aumento na perda de peso de todos os tratamentos durante o tempo secagem (Tabela 1).

Tabela 1. Percentual da Perda de peso dos salames

<b>Amostras</b>	<b>Dia 4</b>	<b>Dia 8</b>	<b>Dia 12</b>
C	31.00 ± 0.62 <sup>aA</sup>	44.00 ± 0.96 <sup>aB</sup>	45.00 ± 0.62 <sup>aB</sup>
B1	32.00 ± 1.31 <sup>aA</sup>	43.00 ± 0.38 <sup>aB</sup>	44.00 ± 1.72 <sup>aB</sup>
B2	33.00 ± 1.39 <sup>aA</sup>	45.00 ± 0.92 <sup>aB</sup>	45.00 ± 0.93 <sup>aB</sup>

(C – 0.020% de sais de cura e sem adição de cultura, B1 – adicionados de 0.7% de cultura + 0.010% de sais de cura, B2- adicionados de 0.7% de cultura + 0,020%de sais de cura). Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna, no mesmo intervalo de tempo, não diferem entre si pelo teste Tukey ( $p < 0.05$ ). Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

A perda de peso foi significativamente afetada pelo tempo de maturação ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3). No 8º dia. os salames apresentaram uma variação de perda 43% - 44% do seu peso, atingindo um total 44% - 45% no 12º dia. Esses valores estão um pouco acima da faixa de

30 a 40% considerada ideal para produtos fermentados secos (Rech 2010). Porém valores semelhantes foram encontrados por alguns autores como Cirolini et al. (2010) no processamento de salame tipo italiano elaborado com culturas starters nativos com perda de peso em torno de 43% e Song et al. (2018) que obtiveram valores entre 49% a 51% em salsichas fermentadas com *B. longum*.

A perda de peso em salame é uma consequência natural durante o processo de fermentação e secagem esta condição ocorre devido à diminuição nos índices de pH que atuam na redução a capacidade de retenção de água (CRA) no salame gerando consequentemente uma menor Aw e uma maior perda de peso (Ruiz et al. 2014). De fato, essa correlação concorda com o que foi observado nas análises de pH e Aw (Fig.2) para o intervalo de tempo do dia 0 ao 8º dia.

### **Oxidação lipídica (TBARS)**

Ao longo do período de fermentação (1º a 12º dia) é possível observar que houve um aumento nos valores de TBARS nos salames (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de TBARS (mg de malonaldeído/ kg de salame) dos salames

<b>Amostras</b>	<b>Dia 0</b>	<b>Dia 12</b>	<b>Dia 28</b>
C	0.046 <sup>aA</sup>	0.412 <sup>aB</sup>	0.484 <sup>aB</sup>
B1	0.061 <sup>aA</sup>	0.499 <sup>aB</sup>	0.656 <sup>aB</sup>
B2	0.040 <sup>aA</sup>	0.525 <sup>aB</sup>	0.669 <sup>aB</sup>

C - 0.020% de sais de cura e sem adição de cultura, B1 – adicionados de 0.7% de cultura + 0.010% de sais de cura, B2- adicionados de 0.7% de cultura + 0,020% de sais de cura. Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna, no mesmo intervalo de tempo, não diferem entre si pelo teste Tukey ( $p < 0.05$ ). Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Comparando-se os tratamentos ao longo do tempo nota-se que não há diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre as amostras. Por outro lado, ao realizar a interação entre tempo

e tratamentos individualmente, os valores de TBARS do 12º e 28º dia diferiram significativamente ( $p < 0.05$ ) dos valores do 1º dia.

Esse aumento no 12º dia que se prolongou durante o período de armazenamento (28º dia) é semelhante ao observado por Cirolini et al. (2010) e Alves et al. (2018). Os índices de oxidação do presente estudo foram menores do que os relatados por Song et al. (2018) ao adicionar B. longum na forma livre e encapsulada em salsichas fermentadas com variações de 1.5–3.16 mg MDA/kg. Ba et al. (2017) também relataram valores superiores aos obtidos neste estudo para um produto semelhante.

Segundo Alves et al. (2018) não existe um consenso quanto ao limiar de detecção de odores devido à presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Alguns autores indicam que em embutidos fermentados o índice de oxidação perceptível sensorialmente é atingido quando os valores de TBARS alcançam 2 mg MDA/kg (Ahmad e Srivastava 2007) estando as amostras do presente estudo abaixo desses valores.

### Cor instrumental

Através da análise dos parâmetros de cor pode se observar algumas diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) (Tabela 3).

Tabela 3. Variação dos parâmetros de cor ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $h^*$  e  $\Delta E$ ) dos salames

$L^*$	Dia 0	Dia 4	Dia 8	Dia 12	Dia 28
<b>C</b>	57.86 ± 1.10 <sup>aA</sup>	52.80 ± 1.32 <sup>aB</sup>	53.34 ± 1.84 <sup>aB</sup>	44.65 ± 0.40 <sup>aC</sup>	40.03 ± 3.53 <sup>aD</sup>
<b>B1</b>	56.46 ± 2.75 <sup>aA</sup>	53.77 ± 1.09 <sup>aB</sup>	52.06 ± 1.18 <sup>aB</sup>	44.34 ± 3.09 <sup>aC</sup>	37.45 ± 1.03 <sup>aD</sup>
<b>B2</b>	60.22 ± 2.46 <sup>bA</sup>	54.47 ± 1.54 <sup>bB</sup>	56.96 ± 1.95 <sup>bB</sup>	48.22 ± 0.39 <sup>bC</sup>	39.93 ± 3.54 <sup>bD</sup>
$a^*$	Dia 0	Dia 4	Dia 8	Dia 12	Dia 28
<b>C</b>	7.23 ± 1.68 <sup>aA</sup>	10.98 ± 1.13 <sup>aB</sup>	10.94 ± 0.42 <sup>aB</sup>	9.92 ± 0.94 <sup>aAB</sup>	11.70 ± 1.55 <sup>aB</sup>
<b>B1</b>	10.36 ± 1.93 <sup>bA</sup>	10.39 ± 0.22 <sup>aA</sup>	12.30 ± 2.41 <sup>aA</sup>	11.08 ± 0.87 <sup>aA</sup>	9.05 ± 1.11 <sup>aA</sup>
<b>B2</b>	9.46 ± 1.58 <sup>abA</sup>	9.13 ± 1.44 <sup>aA</sup>	11.33 ± 1.01 <sup>aA</sup>	10.73 ± 1.15 <sup>aA</sup>	10.46 ± 0.97 <sup>aA</sup>
$b^*$	Dia 0	Dia 4	Dia 8	Dia 12	Dia 28

<b>C</b>	17.99 ± 2.21 <sup>aA</sup>	14.31 ± 2.70 <sup>aA</sup>	10.99 ± 0.53 <sup>aB</sup>	7.42 ± 0.29 <sup>aC</sup>	10.74 ± 2.04 <sup>aBC</sup>
<b>B1</b>	15.30 ± 2.02 <sup>aA</sup>	15.16 ± 0.88 <sup>aA</sup>	12.31 ± 1.40 <sup>aB</sup>	8.70 ± 0.23 <sup>aC</sup>	9.61 ± 3.88 <sup>aBC</sup>
<b>B2</b>	16.32 ± 0.66 <sup>aA</sup>	16.03 ± 0.44 <sup>aA</sup>	13.20 ± 2.42 <sup>aB</sup>	10.39 ± 1.28 <sup>aC</sup>	12.03 ± 3.52 <sup>Abc</sup>
<b>C*</b>	<b>Dia 0</b>	<b>Dia 4</b>	<b>Dia 8</b>	<b>Dia 12</b>	<b>Dia 28</b>
<b>C</b>	19.41 ± 2.09 <sup>aA</sup>	18.05 ± 2.28 <sup>aA</sup>	15.05 ± 0.09 <sup>aAB</sup>	12.40 ± 0.55 <sup>aC</sup>	15.96 ± 1.44 <sup>aBC</sup>
<b>B1</b>	18.49 ± 2.22 <sup>aA</sup>	18.39 ± 0.70 <sup>aA</sup>	17.42 ± 2.18 <sup>aAB</sup>	14.10 ± 0.51 <sup>aC</sup>	13.32 ± 2.81 <sup>aBC</sup>
<b>B2</b>	18.92 ± 0.32 <sup>aA</sup>	18.48 ± 0.75 <sup>aA</sup>	17.42 ± 2.03 <sup>aAB</sup>	14.94 ± 1.39 <sup>aC</sup>	16.11 ± 1.90 <sup>aBC</sup>
<b>h*</b>	<b>Dia 0</b>	<b>Dia 4</b>	<b>Dia 8</b>	<b>Dia 12</b>	<b>Dia 28</b>
<b>C</b>	68.26 ± 2.53 <sup>abA</sup>	52.21 ± 2.21 <sup>abB</sup>	45.14 ± 2.01 <sup>abBC</sup>	36.89 ± 2.66 <sup>abC</sup>	42.39 ± 5.33 <sup>abBC</sup>
<b>B1</b>	56.02 ± 1.54 <sup>baA</sup>	55.53 ± 0.83 <sup>baA</sup>	45.29 ± 2.30 <sup>baB</sup>	38.20 ± 2.16 <sup>baB</sup>	45.39 ± 7.07 <sup>baB</sup>
<b>B2</b>	59.93 ± 4.13 <sup>aA</sup>	60.43 ± 2.99 <sup>aA</sup>	49.08 ± 2.33 <sup>aAB</sup>	44.06 ± 0.77 <sup>aB</sup>	48.13 ± 7.96 <sup>aAB</sup>
<b>ΔE</b>	<b>C – B1</b>	<b>C – B2</b>	<b>B1 – B2</b>		
	1,79	4,76	4,24		

C – 0.020% de sais de cura e sem adição de cultura, B1 – adicionados de 0.7% de cultura + 0.010% de sais de cura, B2- adicionados de 0.7% de cultura + 0,020% de sais de cura. Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna, no mesmo intervalo de tempo, não diferem entre si pelo teste Tukey ( $p < 0.05$ ). Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Entre os valores de  $L^*$  referente à luminosidade observa-se uma diferença significativa ( $p > 0.05$ ) no 8º dia de processamento. Ao longo do tempo de fermentação, maturação e armazenamento observa-se um declínio nos valores de  $L^*$  em todos os tratamentos gerando uma diferença ( $p > 0.05$ ) no 12º e 28º dia, indicando que as amostras escureceram. Assim como neste estudo outros autores como Sayas-Barberá et al. (2012) e Wójciak et al. (2012) relataram uma diminuição nos valores de  $L^*$ .

A redução do valor de  $L^*$  segundo Ramos e Gomide (2017) está diretamente ligada a perda de umidade do produto o que leva ao escurecimento do mesmo. Os altos valores de  $A_w$  encontrados nos embutidos no primeiro dia aumentam a reflexão da luz sobre sua

superfície conferindo maior luminosidade à medida que os embutidos perdem água ocorre o escurecimento causado pela redução da reflexão da luz. Esta relação pode ser comprovada ao se observar os níveis de  $A_w$  do presente estudo (Fig. 2b).

Quanto a intensidade de vermelho ( $a^*$ ) não foram encontradas diferenças significativas ( $P < 0.05$ ) entre os tratamentos ao longo do tempo (Tabela 3). No entanto o tratamento controle (C) diferiu significativamente todos os dias com exceção do 12º dia de processamento ao longo deste período nota-se um aumento seguido da diminuição do valor de  $a^*$  voltando a aumentar durante o armazenamento enquanto os tratamentos B1 e B2 não apresentaram diferença estatística.

Valores elevados de  $a^*$  estão relacionados à formação de nitrosomioglobina e a diminuição da  $A_w$  devido ao aumento da concentração de pigmento heme (Sayas-Barbera et al. 2012). Por outro lado, a diminuição nos valores de  $a^*$  encontrada em todos os tratamentos provavelmente ocorreu devido a reações de oxidação lipídica e oxidação do pigmento nitrosomioglobina resultando em metamioglobina que reduzem a intensidade da cor, fato também abordado por Wójciak et al. (2012).

Para a intensidade de amarelo ( $b^*$ ) (Tabela 3), não houve diferença significativa ( $p > 0.05$ ) até o 4º dia de processamento para o controle (C), enquanto, os tratamentos B1 e B2 não tiveram diferença significativa ( $p > 0.05$ ) até o 8º dia. Entre os tratamentos, não foi observada diferença significativa ( $p \leq 0.05$ ).

Segundo Rubio (2008), um leve aumento nos valores de  $b^*$  após 28 dias de estocagem, podem estar ligadas a oxidação lipídica, que eleva a intensidade do amarelo através da rancidez. Assim, os índices de TBARS (Tabela 2) e os valores de  $A_w$  (Fig2b) validam as hipóteses levantadas tanto para os índices de  $a^*$  quanto de  $b^*$ .

Como os índices de vermelho ( $a^*$ ) e amarelo ( $b^*$ ) se mantiveram instáveis, ouve uma variação nos valores obtidos para os parâmetros de  $C^*$  e  $h^*$  (Tabela 3), uma vez que esses

parâmetros são calculados em função de  $a^*$  e  $b^*$ . Em ambos os parâmetros se observa uma diferença significativa ( $p \leq 0.05$ ) para todos os tratamentos ao longo do tempo, a partir do 8º e 4º dia, para  $C^*$  e  $h^*$ , respectivamente. Entre os tratamentos, somente  $h^*$  apresentou diferenças ( $p \leq 0.05$ ), onde os salames com o probiótico diferiram significativamente entre si.

Segundo a AMSA (2012) o índice  $C^*$  indica a intensidade do tom, valores elevados indicam coloração mais intensa ou altamente cromática parecendo luminosa ou concentrada valores reduzidos indicam cor acinzentada, acromática, fraca ou diluída. Assim pode-se observar que as amostras estavam mais opacas, ocorrendo uma queda na intensidade de cor até o 12º dia, onde os maiores valores de  $C^*$  indicam cores mais vívidas.

O ângulo de tonalidade ( $h^*$ ) determina vivacidade da cor, sendo expresso em graus com seus valores de 0º para vermelho (+a), 90º para amarelo (+b), 180º para verde (-a) e 270º para azul (-b) (AMSA 2012). Os valores para este parâmetro 38 variaram de 36º - 68º, com uma variação de cor indo do vermelho para o laranja avermelhado.

Os valores de variação total da cor ( $\Delta E$ ) (Tabela 3) obtida da interação entre os tratamentos, mostra uma diferença mínima para a interação entre C-B1 ( $\Delta E > 1$ ), diferente do que se é observado ao se realizar a interação de B2 com os demais tratamentos que mostra uma diferença perceptível ( $\Delta E > 3$ ). Essa maior diferença pode ser constatada também pelos resultados obtidos para o parâmetro de cor na análise sensorial.

### **Análises microbiológicas**

A contagem de células viáveis das microcápsulas foi de 11.66 log UFC/g. No 1º dia após o embutimento, os salames apresentaram contagem de 6.52 log UFC/g e 8.25 log UFC/g para os tratamentos B1 e B2, respectivamente. Com relação ao período de processamento (12º dia) observou-se um aumento no número de células viáveis para o B1. 8.64 log UFC/g, diferente do que foi observado para B2, 7.73 log UFC/g, que obteve uma diminuição na contagem.

Ao final do período de armazenamento de 28 dias nota-se que B2 apresentou uma contagem mais alta, 7.85 log UFC/g. quando comparados a B1, com 7.60 log UFC/g. Esse aumento mostra que a microencapsulação, assim como esperado, contribuiu para que ambos os tratamentos tivessem uma maior viabilidade, mostrando ser uma técnica eficiente em manter as células viáveis.

Segundo Nascimento (2007) os sais de cura são utilizados por diversas razões, entre elas a redução de atividade de água devido a diminuição nos índices de pH. Valores mais altos de pH, podem ser indícios de que o processo de fermentação pode não ter sido efetivo na produção de ácido lático (Song et al. 2018). Greco et al. (2004) e Olesen (2004) relataram que elevados índices de pH, podem indicar o aumento de atividade proteolítica com a formação de peptídeos, aminoácidos e compostos nitrogenados.

Presume-se que a redução nos teores de sais de cura e a presença de substâncias causadas por índices de pH mais altos, tenham afetado a estabilidade das microcápsulas, fazendo com que estas se rompessem mais rápido liberando o microrganismo. Isso explicaria o comportamento observado para os salames do tratamento B1(0.010% de sais de cura). Por outro lado, os salames do tratamento B2 (0.020% de sais de cura) mostraram-se mais estáveis, possivelmente pela maior quantidade de sais de cura.

Segundo Sidira et al. (2016), os sais de cura são adicionados aos salames para inibir o crescimento de microrganismos, como *Salmonella* spp. e *Clostridium* spp. esse meio mais ácido e a falta de competitividade com outros microrganismos podem ter auxiliado para que o probiótico fosse capaz de sobreviver e permanecer viável a medida que fosse liberado.

Apesar da redução de células probióticas observadas em B1, ambos os tratamentos (B1 e B2) próximos de 8 Log UFC/g (Anvisa 2018). No entanto, alguns autores como Huckle e Zhang (2011) recomendam uma dose diária de 6 - 12 Log UFC/g células viáveis por dia.

Os resultados das análises microbiológicas como indicativo da qualidade do produto indicaram ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de amostra. Para coliformes termotolerantes a 35 °C e a 45 °C, obteve-se contagens inferiores a 1 log UFC/g, para todos os tratamentos.

Todos os resultados estavam de acordo com a legislação brasileira (Brasil 2001). Para Bis-Souza et al. (2019), a ausência destes microrganismos pode ser atribuída ao baixo valor de pH e alta quantidade de bactérias lácticas presentes no produto, que são fatores de conservação para embutidos fermentados e promovem a segurança do produto. A boa qualidade da matéria-prima e as boas práticas de fabricação utilizadas no processo também podem ter contribuído para esses resultados.

### Análise sensorial

Quanto á aceitação, as médias dos atributos avaliados mostraram diferença significativamente ( $p < 0.05$ ) entre as amostras (Tabela 4).

Tabela 4. Atributos sensoriais dos salames com BB12.

	<b>C</b>	<b>B1</b>	<b>B2</b>
<b>Cor</b>	6.13±1.81 <sup>b</sup>	5.97±1.97 <sup>b</sup>	7.01±1.57 <sup>a</sup>
<b>Aparência</b>	6.20±1.91 <sup>b</sup>	5.83±1.94 <sup>b</sup>	6.79±1.76 <sup>a</sup>
<b>Aroma</b>	6.27±1.67 <sup>b</sup>	6.11±1.58 <sup>b</sup>	6.78±1.57 <sup>a</sup>
<b>Sabor</b>	6.40±2.17 <sup>b</sup>	6.44±1.93 <sup>b</sup>	7.07±1.61 <sup>a</sup>
<b>Textura</b>	6.52±1.97 <sup>a</sup>	6.26±1.92 <sup>a</sup>	6.71±1.83 <sup>a</sup>
<b>Impressão global</b>	6.26±2.17 <sup>ab</sup>	5.96±2.06 <sup>b</sup>	6.73±1.91 <sup>a</sup>

C – 0.020% de sais de cura e sem adição de cultura), B1 – adicionados de 0.7% de cultura + 0.010% de sais de cura, B2- adicionados de 0.7% de cultura + 0,020% de sais de cura. Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste Tukey ( $p < 0.05$ ).

Os parâmetros sensoriais avaliados, de maneira geral, apresentaram médias em torno de 6.00 para os tratamentos C e B1, e 7.00 para os salames do tratamento B2, estando assim, entre os termos “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente” da escala. Médias inferiores foram relatadas Song et al (2018) em salsichas fermentadas contendo probióticos na forma livre e encapsulada.

Para os atributos cor, aparência, aroma e sabor, é possível notar que os tratamentos C e B1, apresentam uma diferença ( $p < 0.05$ ) quando comparados aos salames do tratamento B2, que possui uma maior aceitação para estes atributos. A diferença estabelecida para cor e aparência podem estar ligadas a diferença perceptível indicada pelos valores de ( $\Delta E$ ) na análise de cor (Tabela 3).

Já a textura não apresentou diferença significativa ( $p < 0.05$ ), mostrando que a redução nos níveis de  $A_w$  (Fig 2b) não deixou a amostra seca e dura. Quanto aos índices de impressão global dos tratamentos, B1 e B2 diferiram significativamente ( $p < 0.05$ ) entre si mas não diferiram de C.

Assim, é possível que a redução na concentração dos sais de cura (B1) e a ausência das microcápsulas probióticas no tratamento controle, tenham afetado a aceitação destes tratamentos, uma vez que B2 apresentou uma maior aceitação quando comparada aos demais tratamentos, indicando que a inserção das microcápsulas não interferiu nas características sensoriais do produto. Tal fato pode ser confirmado com o percentual de intenção de compra onde B2 obteve um maior percentual (59% ) para “certamente compraria” do que C (54%) e B1 (43%).

## **Conclusão**

No presente estudo, verificou-se que adição de microcápsulas contendo BB12 não afetou os índices de pH,  $A_w$ , perda de peso, TBARS e cor instrumental para os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , estando os resultados dentro do esperado para este tipo de produto. Por outro lado, as variações de cores obtidas ( $\Delta E$ ) mostram uma diferença perceptível entre os tratamentos, sendo está também notada durante a análise sensorial, onde os salames do tratamento B2 obtiveram uma melhor aceitação em todos os parâmetros, com exceção do atributo textura, e uma maior intenção de compra.

Por fim, pode-se concluir que o efeito protetor da microencapsulação foi evidente, por permitir o aumento da viabilidade nos produtos finais, uma vez estavam presentes no período de armazenamento. Os salames do tratamento B2 mesmo tendo o maior percentual de sais de cura (0.020%), apresentaram uma liberação mais estável das microcápsulas e uma maior viabilidade no período de armazenamento, bem como uma maior aceitação. Mostrando que é possível a incorporação de *Bifidobacterium* BB-12, na concentração avaliada, em embutido cárneo tipo salame e ainda obter bons resultados tecnológicos e sensoriais.

## Referências

Ahmad S, Srivastava PK (2007) Quality and shelf life evaluation of fermented sausages of buffalo meat with different levels of heart and fat. *Meat Science*, v.75, p.603-603. doi: 10.1016/j.meatsci.2006.09.008.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 241, de 26 de julho de 2018. Requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. *Diário Oficial da União*, Dec. 144, 2018.

AMSA. (2012). Meat color measurement guidelines, American meat science association. champaign, IL. Acess: < [https://meatscience.org/docs/default-source/publications-resources/hot-topics/download-the-ebook-format-pdf-of-the-meat-color-measurement-guidelines.pdf?sfvrsn=a218b8b3\\_0](https://meatscience.org/docs/default-source/publications-resources/hot-topics/download-the-ebook-format-pdf-of-the-meat-color-measurement-guidelines.pdf?sfvrsn=a218b8b3_0)>.

AOAC. (2014) Association of Official Analytical Chemistry. Método 061301.

Alves LL, Silva MS, Flores DRM, Athayde DR et al (2018). Effect of ultrasound on the physicochemical and microbiological characteristics of Italian salami. *J Food Sci Technol* 106:363–3733. doi: 106 (2018) 363–373364

Ba HV, Seo HW, Cho SH, Kim YS et al (2017). Utilisation possibility of *Enterococcus faecalis* isolates from neonate's faeces for production of fermented sausages as starter

cultures. *International Journal of Food Science and Technology*, 52:1660–1669. doi: 10.1111/ijfs.13440

Bis-Souza CV, Ozaki MM, Vidal VAS, Pollonio MAR et al (2019). Can dietary fiber improve the technological characteristics and sensory acceptance of low-fat Italian type salami?. *J Food Sci Technol*. 11:1-10. doi:10.1007/s13197-019-04133-6

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa no. 22 de 31 de julho de 2000. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Salames. *Diário Oficial da União, Brasília*, 03 de agosto de 2000. p. 15-28.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 241, de 26 de julho de 2018. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa no. 22 de 31 de julho de 2000. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. *Diário Oficial da União, Brasília*, 27 de julho de 2018. p. 97.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico de Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Disponível em: < [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffddf63767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf63767-4527-bfac-740a0400829b)>. Acesso em: 23 de jul. de 2019.

Chavarri M, Maranon I, Ares R, Ibanez F C et al (2010) Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, v. 142, p. 185-189. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.022>

Cecchini M, Contini M, Massantini R, Monarca D, Moscetti R (2011) Effects of controlled atmospheres and low temperature on storability of chestnuts manually and mechanically

harvested. *Postharvest Biology and Technology*, 61(2):131-136. doi: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.03.001>

Cirolini A, Fries LLM, Terra NN, Milani LIG et al (2010) Salame tipo italiano elaborado com culturas starters nativas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(1):171-179. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000500026>

Di Cagno R, Lòpez CC, Tofalo R, Gallo G et al (2008) Comparison of the compositional, microbiological, biochemical and volatile profile characteristics of three Italian PDO fermented sausages. *Meat Science*, 79(2): 224-235. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.09.006>

Dutcosky, S. D. (2011). *Análise sensorial de alimentos* (3. ed.). Curitiba: Champagnat.

Favaro-Trindade CS, Santana AS, Monterrey-Quintero ES, Trindade MA, Netto FM (2010) The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food Hydrocolloids*, 24:336–340. doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.10.012

Glisic M, Baltic M, Glisic M, Trbovic D et al (2019) Inulin-based emulsion-filled gel as a fat replacer in prebiotic- and PUFA-enriched dry fermented sausages. *International Journal of Food Science and Technology*, 54:787–797. doi: 10.1111/ijfs.13996

Greco M, Mazzette R, De Santis EPL, Corona A, Cosseddu AM (2005). Evolution and identification of lactic acid bacteria isolated during the ripening of Sardinian sausages. *Meat Science*, 69:733–739. doi: 10.1016/j.meatsci.2004.11.004

Huckle B, Zhang Z (2011) Maintenance and protection of probiotics. In: LIONG, M.-T. (Ed.). *Probiotics*. p. 87-108. Berlin/Heidelberg: Springer.

International Dairy Federation (IDF). *Bulletin of the IDF* n° 411/2007. Selective enumeration of bifidobacteria in dairy products: development of a standard method, 20 p., 2007.

Lian WC, Hsiao HC, Chou CC (2002) Survival of bifidobacteria after spray-drying. *International Journal of Food Microbiology*, 74:79–86. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00733-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00733-4)

Nascimento R, Campagnol PCB, Monteiro ES, Pollonio MAR (2007) Substituição de cloreto de sódio por cloreto de potássio: influência sobre as características físico-químicas e sensoriais de salsicha. *Alimentos e Nutrição*, 18(3):297-302.

Prado N, Sampayo M, González P, Lombó F, Díaz J (2019) Physicochemical, sensory and microbiological characterization of Asturian Chorizo, a traditional fermented sausage manufactured in Northern Spain. *Meat Sci* 156:118–124. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.05.023>

Prisco, A., Mauriello, G. (2016) Probiotication of foods: a focus on microencapsulation tool. *Trends in Food Science & Technology*, v.48, p.27-39. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.009>

Ramos EM & Gomide LAM (2017) *Avaliação da Qualidade de Carnes: Fundamentos e Metodologias* (2a Ed. ed.). Viçosa: Editora UFV.

Raharjo S, Sofos J, Schimidt, RG (1992) Improved speed, specificity, and limit of determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid-C18 method for measuring lipid peroxidation in beef. *J. Agric. Food Chem.*, 40: 2182-2185. doi: <https://doi.org/10.1021/jf00023a027>

Rech, Regina. A. (2010) *Produção de Salame tipo Italiano com teor de sódio reduzido*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

Rubio B, Martínez B, García-Cachán MD, Rovira J et al (2008) Effect of the packaging method and the storage time on lipid oxidation and colour stability on dry fermented sausage salchichón manufactured with raw material with a high level of mono and

polyunsaturated fatty acids. Meat Science, 80: 1182-1187. doi: 10.1016/j.meatsci.2008.05.012

Ruiz JN, Villanueva NDM, Favaro-Trindade CS, Contreras-Castillo CJ (2014) Physicochemical, microbiological and sensory assessments of Italian salami sausages with probiotic potential. Scientia Agricola, 71(3):204-21. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162014000300005>

Sayas-Barberá E, Viuda-Martos M, Fernández-López F, Pérez-Alvarez JA et al (2012). Combined use of a probiotic culture and citrus fiber in a traditional sausage '*Longaniza de Pascua*'. Food Control, 27:343-350. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.009>

Shahidi F, Synowiecki J (1985) Protein hydrolyzates from seal meat as phosphate alternatives in food processing applications, Food Chemistry, 60(1):29-32. doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00296-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00296-8)

Sidira M, Kandyli P, Kanellaki M, Kourkoutas Y (2016) Effect of curing salts and probiotic cultures on the evolution of flavor compounds in dry-fermented sausages during ripening. Food Chemistry, 201:334-338. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.084>

Silva N, Junqueira VA, Silveira NFA (2007). Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela, 3:103-122.

Song MY, Hoa VB, Park WS, Yoo JY et al (2018) Quality characteristics of functional fermented sausages added with encapsulated probiotic bifidobacterium *longum* KACC 91563. Korean J. Food Sci. An., 38(5):981-994. doi: <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.e30>

Trzaskowska M, Kołożyn-Krajewska D, Wójciak K, Dolatowski Z (2014) Microbiological quality of raw-fermented sausages with *Lactobacillus casei* LOCK 0900 probiotic strain. Food Control. 35(1):184-191. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.002>

Wang B, Pace RD, Dessai AP, Bovell-Benjamin A, Phillips B (2002) Modified extraction method for determining 2-Thiobarbituric acid values in meat with increased specificity and simplicity. *Journal of Food Science*, 67(8):2833-2836. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08824.x>

Wójciak KM, Dolatowski ZJ, Kolożyn-Krajewska D, Trzaskowska M (2012). The effect of the *Lactobacillus casei* LOCK0900 probiotic strain on the quality of dry-fermented sausage during chilling storage. *Journal of Food Quality*, 35:353-365. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2012.00458.x>

Zinardi E, Ghidini S, Conter M, Ianieri A (2010) Mineral composition of Italian salami and effect of NaCl partial replacement on compositional, physico-chemical and sensory parameters. *Meat Science*, 86(3):742-747. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.06.015>.