

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

**MICROCÁPSULAS PROBIÓTICAS APLICADAS À
PRODUÇÃO DE SALAME TIPO ITALIANO**

TESE DE DOUTORADO

Pablo Teixeira da Silva

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

MICROCÁPSULAS PROBIÓTICAS APLICADAS À PRODUÇÃO DE SALAME TIPO ITALIANO

Pablo Teixeira da Silva

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Ciência e
Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,
RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Orientadora: Prof.^a PhD Leadir Lucy Martins Fries

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

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

Teixeira da Silva, Pablo
Microcápsulas probióticas aplicadas à produção de salame tipo Italiano / Pablo Teixeira da Silva.-2014.
68 p.; 30cm

Orientadora: Leadir Lucy Martins Fries
Coorientador: Cristiano Ragagnin de Menezes
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2014

1. microencapsulação 2. Bifidobacterium animalis 3. Lactobacillus acidophilus 4. salame tipo Italiano I. Lucy Martins Fries, Leadir II. Ragagnin de Menezes, Cristiano III. Título.

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

À Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**MICROCÁPSULAS PROBIÓTICAS APLICADAS À PRODUÇÃO DE
SALAME TIPO ITALIANO**

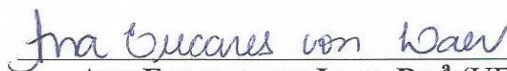
elaborada por
Pablo Teixeira da Silva

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

COMISSÃO EXAMINADORA:



Leadir Lucy Martins Fries, PhD
(Presidente/Orientadora)



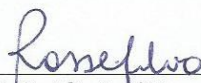
Ana Eucares von Laer, Dr.^a (UFSM)



Vanessa Pires da Rosa, Dr.^a (UFSM)



Mariane Lobo Ugalde, Dr.^a (IFFARROUPILHA)



Rosselej Caiél da Silva, Dr.^a (URI)

Santa Maria, 18 de dezembro de 2014.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Cleise e ao meu filho Davi, agradeço pelo amor, compreensão, estímulo, companheirismo e por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos.

À minha família, agradeço pelo apoio e suporte.

À professora Leadir Lucy Martins Fries, agradeço pelo exemplo profissional, orientação, confiança, estímulo, amizade e, sobretudo a oportunidade de poder trabalhar e aprender com ela.

Ao professor Cristiano Ragagnin de Menezes, agradeço pela amizade e inestimável colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À professora Cristiane de Bona da Silva e ao professor Fernando Teixeira Nicoloso, agradeço pela gentileza do empréstimo dos equipamentos e laboratórios.

À Carla Schwan, Augusto Holkem, Évelin Wigmann, Juliana Bastos, Mariana Motta, Roseane Ribeiro, Hilda Hildebrand, Daniele Kleovan e Janaína Borba, agradeço pela ajuda sempre demonstrada no desenvolvimento da tese.

Aos meus colegas do CAFW pela ajuda incansável.

Agradeço a todos que, de uma maneira ou de outra, colaboraram para que este trabalho fosse desenvolvido.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

MICROCÁPSULAS PROBIÓTICAS APLICADAS À PRODUÇÃO DE SALAME TIPO ITALIANO

AUTOR: PABLO TEIXEIRA DA SILVA

ORIENTADORA: LEADIR LUCY MARTINS FRIES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 18 de dezembro de 2014.

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver microcápsulas probióticas de *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus* avaliando a sobrevivência dos probióticos microencapsulados sob condições gastrointestinais simuladas e a viabilidade durante armazenamento sob diferentes temperaturas, com posterior aplicação à produção de salames tipo Italiano avaliando seus efeitos sobre as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do salame. Ensaios de sobrevivência foram conduzidos para avaliar a resistência dos probióticos microencapsulados às condições gastrointestinais simuladas e a viabilidade durante 120 dias de armazenamento a 4°C e 25°C, além da análise morfológica das microcápsulas. As microcápsulas apresentaram forma esférica, com superfície contínua relativamente lisa e sem fissuras, protegendo os probióticos das condições gastrointestinais simuladas quando comparado a probióticos livres, permanecendo com maior viabilidade após 120 dias de armazenamento à 4°C, para ambos os micro-organismos. Após, as microcápsulas probióticas foram adicionadas à produção de salame tipo Italiano, gerando três tratamentos, sendo T1 o controle e T2 e T3 com adição de microcápsulas de *B. animalis* e *L. acidophilus*, respectivamente. Foram realizadas análises de atividade de água, pH, umidade, perda de peso, contagem de coliformes à 45°C e *Staphylococcus* coagulase positiva e detecção de *Salmonella* spp. e o acompanhamento das culturas probióticas microencapsuladas, todas as análises ocorreram durante os 120 dias; além da análise sensorial do salame após 30 dias e mensalmente até 120 dias. Através dos resultados constatou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos com relação às análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. Os tratamentos T2 e T3 mantiveram contagens de *B. animalis* e *L. acidophilus* acima de $6 \log \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ até 90 dias. Portanto, é possível a produção de salames tipo Italiano com propriedades probióticas. No entanto, sugere-se que salames probióticos devem ser projetados de tal forma que os micro-organismos possam manter sua viabilidade até o final do prazo de validade do produto, seja alterando a estrutura da microcápsula ou aumentando a carga microbiana inicial ou reduzindo a vida de prateleira do produto.

Palavras-chaves: *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus*, microencapsulação.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Post Graduate Program in Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

PROBIOTIC MICROCAPSULES APPLIED TO PRODUCTION OF ITALIAN SALAMI

AUTHOR: PABLO TEIXEIRA DA SILVA

ADVISER: LEADIR LUCY MARTINS FRIES

Place and Date of Defense: Santa Maria, December 18th, 2014.

The aim of this study was to develop probiotic microcapsules of *Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus acidophilus* evaluating the survival of the microencapsulated probiotics under simulated gastrointestinal conditions and availability during storage at different temperatures, with further application to the production of Italian salami evaluating their effects on the physicochemical, microbiological and sensory characteristics of salami. Survival assays were conducted to evaluate the resistance of the microencapsulated probiotic to simulated gastrointestinal conditions and availability during 120 days of storage at 4°C and 25 ° C, besides to morphological analysis of the microcapsules. The microcapsules showed spherical shape with relatively smooth and continuous surface without cracks, protecting the probiotics from simulated gastrointestinal conditions when compared to free probiotics, remained with greater viability after 120 days of storage at 4°C for both microorganisms. After probiotic microcapsules were added to the production of Italian salami, generating three treatments: T1 control and T2 and T3 with the addition of microcapsules of *B. animalis* and *L. acidophilus*, respectively. Analyzes of water activity, pH, moisture, weight loss, coliform at 45°C, *Staphylococcus* coagulase positive and *Salmonella* spp. detection were realized and monitoring the microencapsulated probiotic cultures, all analyzes were conducted during 120 days; beyond sensory analysis of salami after 30 days and monthly up to 120 days. There were no significant difference ($p>0,05$) between the treatments in relation to physicochemical, microbiological and sensory analyses. The treatments T2 e T3 maintained counts of *B. animalis* and *L. acidophilus* above 6 log CFU·g⁻¹ to 90 days. Therefore, the production of probiotic Italian salami is possible. However, it is suggested that probiotics salamis should be designed such that the microorganisms can maintain their availability until the end of the shelf life of the product, either by changing the structure of the microcapsule or increasing the microorganism initial number or reducing the shelf life of the product.

Keywords: *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus*, microencapsulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 1

- Figura 1 – Sobrevivência dos micro-organismos *B. animalis* (BA) e *L. acidophilus* (LA) livres e encapsulados às condições gastrointestinais simuladas..... 37
- Figura 2 – Imagens do microscópio eletrônico de varredura para microcápsulas de *B. animalis* (A, 2000x) e *L. acidophilus* (B, 2000x)..... 38

ARTIGO 2

- Figura 1 – Valores de atividade de água, pH, umidade e perda de peso dos salames durante os 120 dias de análises. Tratamento 1: controle; Tratamento 2: adição de microcápsulas de *B. animalis* e Tratamento 3: adição de microcápsulas de *L. acidophilus*..... 52
- Figura 2 – Contagens de *B. animalis* e *L. acidophilus* nos salames durante os 120 dias de análises. Tratamento 2: adição de microcápsulas de *B. animalis* e Tratamento 3: adição de microcápsulas de *L. acidophilus*..... 53

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Table 1 – Wall materials and their potential release mechanisms.....	17
Table 2 – Encapsulation methods and sizes of capsules.....	19

ARTIGO 1

Tabela 1 – Viabilidade das microcápsulas (log UFC.g ⁻¹) de <i>B. animalis</i> e <i>L. acidophilus</i> armazenadas durante 120 dias sob diferentes temperaturas.....	36
---	----

ARTIGO 2

Tabela 1 – Perfil sensorial e intenção de compra dos salames tipo Italiano adicionados de microcápsulas de <i>B. animalis</i> (T2) e <i>L. acidophilus</i> (T3) aos 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento.....	54
---	----

LISTA DE ANEXOS

ARTIGO 2

Anexo A –	Ficha sensorial utilizada para aplicação do teste de comparação múltipla e intenção de compra dos salames tipo Italiano com probióticos.....	64
-----------	--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Objetivos.....	15
1.1.1 Objetivo geral.....	15
1.1.2 Objetivos específicos.....	15
2 DESENVOLVIMENTO.....	16
2.1 Revisão bibliográfica – Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology.....	16
Abstract.....	17
Resumo.....	17
Introduction.....	17
Capsule.....	18
Wall materials.....	18
Controlled core release.....	18
Some encapsulation methods.....	19
Conclusion.....	21
References.....	22
2.2 Artigo 1 – Microencapsulação de probióticos por <i>spray drying</i>: avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento.....	25
Resumo.....	26
Abstract.....	26
Introdução.....	27
Materiais e métodos.....	28
Resultados e discussão.....	30
Conclusão.....	32
Referências.....	33
2.3 Artigo 2 – Avaliação do efeito da adição de microcápsulas probióticas às características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de salame tipo Italiano..	41
Resumo.....	42
Abstract.....	42
Introdução.....	43
Materiais e métodos.....	44
Resultados e discussão.....	46

Conclusão.....	48
Referências.....	49
3 DISCUSSÃO.....	57
4 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	62
ANEXOS.....	66

APRESENTAÇÃO

Essa tese segue as normas estabelecidas na Estrutura e Apresentação de Monografias, Dissertações e Teses – MDT da UFSM (UFSM, 2012). Os resultados estão apresentados sob a forma de dois artigos científicos os quais se encontram no item “**DESENVOLVIMENTO**”, assim com uma revisão bibliográfica. As seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão e Referências encontram-se nos artigos científicos e representam a íntegra desse trabalho. Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÃO**, encontrados no final desta tese, apresentam interpretações e comentários gerais a respeito dos resultados demonstrados nos artigos científicos contidos neste trabalho. As **REFERÊNCIAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **DISCUSSÃO** desta tese.

1 INTRODUÇÃO

A microencapsulação pode ser definida como a tecnologia de empacotamento de sólidos, líquidos ou gases, com filmes poliméricos, formando pequenas partículas denominadas microcápsulas (GHARSALLAOUI et al., 2007). A microcápsula consiste em uma camada de um agente encapsulante que atua como um material de parede, isolando a substância ativa (núcleo) e evitando o efeito de sua exposição inadequada. Essa membrana se desfaz através de estímulo específico, liberando a substância no local ou momento ideal (SUAVE, 2006).

Dentre as inúmeras aplicações da microencapsulação podemos destacar as áreas farmacêutica, de agrotóxicos, médica e o setor alimentício, tais como: a encapsulação de óleos essenciais, corantes, aromatizantes, edulcorantes, acidulantes, vitaminas, minerais, sais, gases, aminoácidos, enzimas, lipídeos (AZEREDO, 2005) e nos últimos tempos tem-se destacado a encapsulação de micro-organismos. Os micro-organismos vêm sendo microencapsulados para uso em alimentos devido, principalmente, ao efeito bactericida do suco gástrico (OLIVEIRA et al., 2007).

A sociedade carece de modificações no seu estilo de vida. Isso se deve em razão do exponencial crescimento dos custos médico-hospitalares, decorrente do envelhecimento da população e o conseqüente aumento na expectativa de vida (ROBERFROID, 2002; SAAD, 2006). A partir desse contexto e da conscientização da população quanto à necessidade do consumo de alimentos mais saudáveis, surgiram os alimentos funcionais, os quais promovem a saúde e o bem-estar, além de sua função de nutrição (COSTA; ROSA, 2010; DOLINSKY, 2009; TYÖPPÖNEN et al., 2003).

Os probióticos são alimentos funcionais definidos como micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002). Dentre os quais podemos destacar a prevenção de câncer de cólon; o aumento da resposta imune; o melhor trânsito intestinal dos alimentos; a redução dos episódios de diarreia; a redução do colesterol sanguíneo e o alívio dos sintomas de intolerância à lactose (WEICHERT et al., 2012).

Devido aos produtos cárneos fermentados, como o salame, serem fabricados com carne crua e consumidos sem prévio aquecimento, o uso de probióticos neste produto mostra-se promissor, visto que, o aquecimento poderia reduzir consideravelmente a população de

probióticos (AMMOR; MAYO, 2007). Entretanto, os produtos cárneos fermentados possuem um ambiente não favorável para a sobrevivência de probióticos devido às suas características de baixo pH (próximo à 5,0) e atividade de água (menor que 0,90), além da presença de sais de cura e de outros micro-organismos competidores, como *Staphylococcus* e *Pediococcus* (LEROY et al., 2006), obstáculos que podem ser minimizados através da microencapsulação.

Alguns autores, como Leroy et al. (2006), Muthukumarasamy e Holley (2006) e Macedo et al. (2008) adicionaram probióticos na forma livre à produtos cárneos fermentados, buscando sua ação como cultura *starter* ou inibição de determinados patógenos, como a *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* ou influência sobre as características tecnológicas e sensoriais. Estes mesmos autores relatam que a adição de culturas probióticas livres acentua o gosto ácido e aumenta a perda de peso do produto final, inviabilizando, muitas vezes, a comercialização do produto.

A microencapsulação de probióticos em produtos cárneos fermentados ainda é incipiente, porém, eficaz na minimização das características negativas citadas anteriormente (HEIDEBACH et al., 2012; POULIN et al., 2010; RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010). Muthukumarasamy e Holley (2006) microencapsularam *Lactobacillus reuteri* em alginato por extrusão e emulsão adicionando as microcápsulas a produtos cárneos fermentados avaliando sua influência nas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do produto fermentado. Ruiz (2011) avaliou os efeitos da incorporação dos micro-organismos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* livres e microencapsulados, em matriz lipídica por *spray cooling*, sobre as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do salame tipo Italiano, assim como a sensibilidade destas culturas frente a diferentes tempos de armazenamento.

A crescente tendência mundial do consumo de alimentos funcionais probióticos aliada à utilização da microencapsulação em alimentos, estimulam o estudo de novos produtos, onde o setor de carnes destaca-se como uma importante área de aplicação (AZEREDO, 2005).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver microcápsulas probióticas de *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus* avaliando a sobrevivência dos probióticos microencapsulados sob condições gastrointestinais simuladas e a viabilidade durante armazenamento sob diferentes temperaturas; com posterior aplicação à produção de salame tipo Italiano avaliando seus efeitos sobre as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do salame.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a sobrevivência dos probióticos microencapsulados sob diversas condições de pH e atividade enzimática simulando as condições do trato gastrointestinal humano;
- Avaliar a viabilidade dos probióticos microencapsulados durante 120 dias de armazenamento a 4°C e 25°C;
- Avaliar a forma e distribuição das microcápsulas probióticas mediante microscopia eletrônica de varredura;
- Acompanhar a evolução da atividade de água, pH, umidade e perda de peso durante a etapa de processamento e armazenamento do salame tipo Italiano;
- Acompanhar a estabilidade microbiológica do salame tipo Italiano durante a etapa de processamento e armazenamento, através da contagem de coliformes à 45°C e *Staphylococcus* coagulase positiva e detecção de *Salmonella* spp.;
- Acompanhar a evolução das culturas probióticas microencapsuladas de *B. animalis* e *L. acidophilus* durante a etapa de processamento e armazenamento do salame tipo Italiano;
- Avaliar sensorialmente o salame tipo Italiano após 30 dias de processamento e durante seu armazenamento.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

MICROENCAPSULATION: CONCEPTS, MECHANISMS, METHODS AND SOME APPLICATIONS IN FOOD TECHNOLOGY

Pablo Teixeira da Silva, Leadir Lucy Martins Fries, Cristiano Ragagnin de Menezes, Augusto Tasch Holkem, Carla Luisa Schwan, Évelin Francine Wigmann, Juliana de Oliveira Bastos

Revisão bibliográfica aceita pela Revista Ciência Rural, em 09/12/13.

Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology

Microencapsulação: conceitos, mecanismos, métodos e algumas aplicações em tecnologia de alimentos

Pablo Teixeira da Silva^{1*} Leadir Lucy Martins Fries¹ Cristiano Ragagnin de Menezes¹
Augusto Tasch Holkem¹ Carla Luisa Schwan¹ Evelin Francine Wigmann¹
Juliana de Oliveira Bastos¹

- REVIEW -

1 ABSTRACT

2
3 *Microencapsulation is a process in which active*
4 *substances are coated by extremely small capsules. It is a new*
5 *technology that has been used in the cosmetics industry as well as in*
6 *the pharmaceutical, agrochemical and food industries, being used*
7 *in flavors, acids, oils, vitamins, microorganisms, among others.*
8 *The success of this technology is due to the correct choice of the*
9 *wall material, the core release form and the encapsulation method.*
10 *Therefore, in this review, some relevant microencapsulation*
11 *aspects, such as the capsule, wall material, core release forms,*
12 *encapsulation methods and their use in food technology will be*
13 *briefly discussed.*

14 **Key words:** *microcapsules, microencapsulation, controlled*
15 *release.*

17 RESUMO

18
19 *A microencapsulação é um processo em que*
20 *substâncias ativas são revestidas por cápsulas extremamente*
21 *pequenas. É uma tecnologia nova, a qual tem sido empregada na*
22 *indústria de cosméticos, farmacêutica, agrotóxicos e alimentícia*
23 *e, nesta, é utilizada em aromas, ácidos, óleos, vitaminas, micro-*
24 *organismos, entre outros. O êxito nessa tecnologia deve-se à*
25 *correta escolha do material encapsulante, da forma de liberação do*
26 *núcleo e do método de encapsulação. Dessa forma, nesta revisão,*
27 *serão abordados, sucintamente, alguns aspectos relevantes da*
28 *microencapsulação, como a cápsula, o material encapsulante, as*
29 *formas de liberação do núcleo, os métodos de encapsulação, assim*
30 *como sua utilização na tecnologia de alimentos.*

31 **Palavras-chave:** *microcápsulas, microencapsulação, liberação*
32 *controlada.*

36 INTRODUCTION

37
38 Microencapsulation may be defined as the
39 packaging technology of solids, liquid or gaseous

1 material with thin polymeric coatings, forming small
2 particles called microcapsules (GHARSALLAOU
3 et al., 2007). The polymer acts as a protective film,
4 isolating the core and avoiding the effect of its
5 inadequate exposure. This membrane dissolves itself
6 through a specific stimulus, releasing the core in the
7 ideal place or at the ideal time (SUAVE, 2006).

8 Microencapsulation has numerous
9 applications in areas such as the pharmaceutical,
10 agricultural, medical and food industries, being
11 widely used in the encapsulation of essential oils,
12 colorings, flavorings, sweeteners, microorganisms,
13 among others (AZEREDO, 2005).

14 Recently, the food industry has
15 demonstrated increasingly complex formulations:
16 as microorganisms in fermented meat; the addition
17 of polyunsaturated fatty acids that are susceptible
18 to auto-oxidation in milk, yogurts or ice creams;
19 and the use of flavor compounds that are highly
20 volatile in instant foods, which often can only be
21 checked by microencapsulation (KHAN et al., 2011;
22 GHARSALLAOU et al., 2012).

23 Microencapsulation can serve as an
24 effective means of creating foods that are not only
25 a source of nutrients with sensory appeal but also
26 a source of well-being and health for individuals,
27 such as by increasing the level of calcium to prevent
28 osteoporosis, using microorganism-produced lactic
29 acid to decrease cholesterol and adding phenolic
30 compounds to prevent heart problems (OLIVEIRA
31 et al., 2002; SANGUANSRI & AUGUSTIN, 2006).
32

¹Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, nº 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: pabloteixeiras@hotmail.com. *Autor para correspondência.

1 In this review, some relevant aspects
2 of microencapsulation, such as the capsule, wall
3 material, core release forms, encapsulation methods
4 and some of their uses in food technology will be
5 briefly discussed.

6 Capsule

8 Generally, capsules can be classified
9 according to their size: macrocapsules (>5,000µm),
10 microcapsules (0.2 to 5,000µm) and nanocapsules
11 (<0.2µm). In terms of their shape and construction,
12 capsules can be divided into two groups:
13 microcapsules and microspheres. Microcapsules are
14 particles consisting of an inner core, substantially
15 central, containing the active substance, which
16 is covered with a polymer layer constituting the
17 capsule membrane. Mononuclear and polynuclear
18 microcapsules can be distinguished by whether the
19 core is divided (FAVARO-TRINDADE et al., 2008).

20 In contrast, microspheres are matrix
21 systems in which the core is uniformly dispersed and/
22 or dissolved in a polymer network. Microspheres
23 may be homogeneous or heterogeneous depending on
24 whether the core is in the molecular state (dissolved)
25 or in the form of particles (suspended), respectively
26 (SILVA et al., 2003).

27 Wall materials

28 The correct choice of the wall material is
29 very important because it influences the encapsulation
30 efficiency and stability of the microcapsule. The ideal
31 wall material should have the following characteristics:
32 not reactive with the core; ability to seal and maintain
33 the core inside the capsule; ability to provide maximum
34 protection to the core against adverse conditions; lack
35 of unpleasant taste in the case of food applicability and
36 economic viability (GHARSALLAOUI et al., 2007;
37 NAZZARO et al., 2012).

38 According to FÁVARO-TRINDADE
39 et al. (2008), most wall materials do not have all
40 the desired properties; a common practice involves
41 mixing two or more materials. Such materials can be
42 selected from a wide variety of natural and synthetic
43 polymers, including the following that we highlight:
44 carbohydrates: starch, modified starches, dextrans,
45 sucrose, cellulose and chitosan; gums: arabic gum,
46 alginate and carrageenan; lipids: wax, paraffin,
47 monoglycerides and diglycerides, hydrogenated oils
48 and fats; inorganic materials: calcium sulfate and
49 silicates; proteins: gluten, casein, gelatin and albumin.

50 Controlled core release

51 According to GOUIN (2004),
52 encapsulation should allow the core to be isolated
53

1 from the external environment until release is
2 desired. Therefore, the release at the appropriate time
3 and place is an extremely important property in the
4 encapsulation process, improving the effectiveness,
5 reducing the required dose of additives and expanding
6 the applications of compounds of interest. The main
7 factors affecting the release rates are related to
8 interactions between the wall material and the core.
9 Additionally, other factors influence the release, such
10 as the volatility of the core, ratio between the core and
11 wall material, particle size and viscosity grade of the
12 wall material (ROBERTS & TAYLOR, 2000).

13 The main mechanisms involved in the core
14 release are diffusion, degradation, use of solvent, pH,
15 temperature and pressure. In practice, a combination
16 of more than one mechanism is used (DESAI &
17 PARK, 2005). Diffusion occurs especially when
18 the microcapsule wall is intact; the release rate is
19 governed by the chemical properties of the core and
20 the wall material and some physical properties of
21 the wall. For example, some acids can be released
22 during a process step but protected by another step.
23 In some cases, some preservatives are required at the
24 product surface, but their spread to other parts must
25 be controlled (AZEREDO, 2005).

26 According to ROSEN (2006), degradation
27 release occurs when enzymes such as proteases
28 and lipases degrade proteins or lipids, respectively.
29 An example is reducing the time required for the
30 ripening of cheddar cheese by 50% compared with the
31 conventional ripening process (HICKEY et al., 2007).

32 In contact with a solvent, the wall material
33 can dissolve completely, quickly releasing the core
34 or start to expand, favoring release. For example,
35 microencapsulation of coffee flavors improves the
36 protection from light, heat and oxidation when in the
37 dry state, but the core is released upon contact with
38 water (FRASCARELI et al., 2012).

39 The pH release occurs because pH changes
40 can result in alterations in the wall material solubility,
41 enabling the release of the core. For example,
42 probiotic microorganisms can be microencapsulated
43 to resist the acid pH of the stomach and only be
44 released in the alkaline pH of the intestine (TOLDRÁ
45 & REIG, 2011).

46 Changes in temperature can promote
47 core release. There are two different concepts:
48 temperature-sensitive release, reserved for materials
49 that expand or collapse when a critical temperature is
50 reached, and fusion-activated release, which involves
51 melting of the wall material due to temperature
52 increase. An example is the fat-encapsulated cheese
53 flavor used in microwave popcorn, resulting in the

1 uniform distribution of the flavor: the flavor is
2 released when the temperature rises to 57-90°C
3 (PARK & MAGA, 2006).

4 Pressure release occurs when a pressure
5 is applied to the capsule wall, such as the release of
6 some flavors during the mastication of chewing gum
7 (WONG et al., 2009). Some wall materials and the
8 possible mechanisms for the microcapsules release
9 are listed in table 1.

10 Some encapsulation methods

11 The choice of the most suitable method
12 depends on the type of core, the application for the
13 microcapsule, the size of the particles required,
14 the physical and chemical properties of the core
15 and the wall, the release mechanism required, the
16 production scale and the cost (SUAVE et al., 2006).
17 According to CABALLERO et al. (2003), the main
18 encapsulation methods are: spray drying, spray
19 cooling, extrusion, coacervation, lyophilization and
20 emulsification.

21 Spray drying

22 This process involves the formation of
23 an emulsion, solution or suspension containing the

1 core and wall material, followed by nebulization
2 in a drying chamber with circulating hot air. The
3 water evaporates instantly in contact with the
4 hot air, and the material encapsulates the core
5 (LAOHASONGKRAM, 2011). Atomization has some
6 advantages over other methods: large equipment
7 availability, possibility of employing a wide variety
8 of encapsulating agents, potentially large-scale
9 production, simple equipment, good efficiency,
10 reduced storage and transport costs and low process
11 cost. The main disadvantage of atomization is
12 the production of non-uniformly sized materials
13 (MADENE et al., 2006).

14 The spray drying technique is the most
15 common microencapsulation method, has been used
16 for decades to encapsulate mainly flavors, lipids, and
17 pigments, but its use in thermo-sensitive products,
18 such as microorganisms and essential oils, can be
19 limited because the required high temperature causes
20 volatilization and/or destruction of the product
21 (GHARSALLAOUI et al., 2007).

22 The sumac flavor has been successfully
23 encapsulated by spray drying in sodium chloride in
24 salted cookies, salads and crackers (BAYRAM et al.,
25

Table 1 - Wall materials and their potential release mechanisms.

Wall Materials	Release Mechanisms			
	Mechanic	Thermal	Dissolution	Chemical
Soluble in water				
Alginate	x		x	
Carrageenan	x		x	
Caseinate	x		x	
Chitosan	x			
Modified cellulose	x		x	
Gelatin	x			
Xanthan gum	x	x		
Arabic gum	x	x		
Latex	x		x	
Starch	x		x	
Insoluble in water				
Ethylcellulose	x			
Fatty alcohols	x	x		x
Fatty acids	x	x		x
Hydrocarbon resin	x	x		
Mono, di and triacyl glycerol	x	x		
Natural waxes	x	x		
Polyethylene	x	x		

Source: adapted from FAVARO-TRINDADE et al. (2008).

2005). KRISHNAN et al. (2005) microencapsulated cardamom oleoresin by spray drying in arabic gum, maltodextrin and modified starch, the results showing an increase in the oleoresin protection. ANEKELLA & ORSAT (2013) optimized the microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying in 91.15%. The encapsulation of lipids in potato starches, tapioca and corn by spray drying has been successful, with no interactions between the encapsulated and wall materials (DRUSCH et al., 2006).

Spray cooling

According to CHAMPAGNE & FUSTIER (2007), spray cooling microencapsulation is based on the injection of cold air to allow solidification of the particle. Microparticles are produced from a mixture containing the core and wall material in droplets. This mixture is nebulized by an atomizer and enters a chamber in which air flows at low temperature. The reduction of temperature results in the solidification of the wall material, enabling the core to be encapsulated.

Spray cooling microencapsulation is considered the cheapest encapsulation technology by employing lower temperatures and with a high potential for scale-up. However, microparticles can present some disadvantages, including low encapsulation capacity and the expulsion of the core during storage. Spray cooling has been used to encapsulate mainly minerals and vitamins (RATHORE et al., 2013).

GAMBOA et al. (2011) microencapsulated tocopherols in a lipid matrix by the spray cooling with values of encapsulation efficiency greater than 90%. WEGMULLER et al. (2006) developed microcapsules by spray cooling that contained iron, iodine and vitamin A to fortify salt using oil hydrogenated palm. The microcapsules obtained were highly stable and no sensory differences were detected. The encapsulating agent maltodextrin was shown to be efficient to prevent the oxidation of linseed oil by spray cooling (GRATTARD et al., 2002).

Extrusion

This method is based on a polysaccharide gel that immobilizes the core when in contact with a multivalent ion. Extrusion involves incorporating the core in a sodium alginate solution, followed by

the mixture undergoing drop-wise extrusion via a reduced caliber pipette or syringe into a hardening solution, such as calcium chloride (SWARBRICK, 2004).

The main advantage of this process is the very long shelf life of flavor compounds due to the provision of an almost impermeable barrier against oxygen. One of the drawbacks of this technology is the rather large particles formed by extrusion (typically 500-1,000µm), which limit the use in applications where mouth-feel is a crucial factor. Additionally, a very limited range of wall materials is available for extrusion encapsulation (GOUIN, 2004).

MIRZAEI et al. (2012) microencapsulated *L. acidophilus* in a calcium alginate gel and resistant starch by extrusion, resulting in an increased survival rate of *L. acidophilus* in Iranian white-brined cheese after 6 months of storage. YULIANI et al. (2006) showed that the microencapsulation of limonene with β -cyclodextrin by extrusion offered an effective means against oxidation.

Coacervation

Coacervation is the technique that involves the deposition of the polymer around the core by altering the physicochemical characteristics of the medium, such as the temperature, ionic strength, pH and polarity (AZEREDO, 2005). It is called simple coacervation when only a single macromolecule is present, whereas when there are two or more molecules of opposite charges is referred to as complex coacervation (FREITAS et al., 2005).

Coacervation is a relatively simple, low-cost process that does not require high temperatures or organic solvents. It is typically used to encapsulate flavor oils (OLIVEIRA et al., 2002). One of the main disadvantages of the coacervation is that occurs only within limited ranges of pH, colloid concentrations and/or electrolyte concentrations (COMUNIAN et al., 2013).

JUN-XIA et al. (2011) microencapsulated sweet orange oil by coacervation with soybean protein isolate, indicating good protection for the core. OLIVEIRA et al. (2007) microencapsulated *B. lactis* and *L. acidophilus* by coacervation with pectin and casein, demonstrating more resistance of the product to gastric and intestinal juices. ROCHA-SELMÍ et al. (2013) encapsulated aspartame by coacervation, improving the protection even at 80°C.

Lyophilization

Lyophilization is a method involving the dehydration of frozen material under a vacuum sublimation process, that is, compound water removal occurs without submitting the sample to high temperatures (CHEN & WANG, 2007).

This method provides excellent quality products because it minimizes the changes associated with high temperature, it is widely used in essences or flavorings. However, its high cost and long process time undermine its commercial applicability (MARQUES et al., 2006). CALVO et al. (2012) microencapsulated extra-virgin olive oil in the presence of maltodextrin, carboxymethylcellulose and lecithin by lyophilization, demonstrating that the oil was unaltered for 9 to 11 months, which increased the shelf life. EZHILARASI et al. (2013) encapsulated garcinia fruit extract in whey protein isolate and maltodextrin by lyophilization and applied in bread that exhibited higher volume, softer crumb texture, desirable colour and sensory attributes.

Emulsification

According ZANETTI (2001), in the microencapsulation by emulsification, first the core is dispersed in an organic solvent where the wall material is. Then, dispersion is emulsified in the water or oil, which contains an emulsion stabilizer. The organic solvent is then removed by evaporation under stirring, providing the formation of compact polymer globules in which the core is encapsulated.

This technique has been frequently used because of the simplicity of the procedures involved in producing the particle and the choice of the components of the formulation and preparation conditions. Emulsification has been used to encapsulate mainly enzymes, minerals, vitamins and microorganisms (AZEREDO, 2005). With the use of encapsulated enzymes by emulsification in cheese production, there was an increased rate of proteolysis compared with free enzyme production (KAILASAPATHY & LAM, 2005). SONG et al. (2013) microencapsulated probiotics by emulsification in alginate-chitosan, demonstrating more resistance in simulated gastrointestinal conditions. Some encapsulation methods and their size ranges of the microcapsules are shown in table 2.

CONCLUSION

Microencapsulation has been applied in a wide variety of products from different areas, and studies have shown an enormous potential to provide the core with advantageous features, resulting in superior quality products, including in the food industry. However, much effort through research and development is still needed to identify and develop new wall materials and to improve and optimize the existing methods of encapsulation for the better use of microencapsulation and its potential applications.

Table 2 - Encapsulation methods and sizes of capsules.

Encapsulation Methods	Core	Size (µm)
Physical Methods		
Spray drying	Liquid/solid	5 – 150
Spray cooling	Liquid/solid	20 – 200
Fluidized bed	Solid	>100
Co-crystallization	Liquid/solid	-
Lyophilization	Liquid	-
Physicochemical Methods		
Simple coacervation	Liquid/solid	20 – 500
Complex coacervation	Liquid/solid	1 – 500
Solvent evaporation	Liquid/solid	1 – 5,000
Liposomes	Liquid/solid	0.02 – 3

Source: adapted from FAVARO-TRINDADE et al. (2008).

REFERENCES

- 1
2
3 ANEKELLA, K.; ORSAT, V. Optimization of microencapsulation of
4 probiotics in raspberry juice by spray drying. *LWT - Food Science
5 and Technology*, v.50, n.1, p.17-24, 2013. Available from: <[http://](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643812003313)
6 www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643812003313>.
7 Accessed: May 20, 2013. doi: 10.1016/j.lwt.2012.08.003.
8
- 9 AZEREDO, H.M.C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de
10 alimentos. *Alimentos e Nutrição*, v.16, n.1, p.89-97, 2005.
11 Available from: <[http://serv-bib.fc.far.unesp.br/seer/index.php/](http://serv-bib.fc.far.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/view/106/119)
12 [alimentos/article/view/106/119](http://serv-bib.fc.far.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/view/106/119)>. Accessed: Jun. 20, 2012. doi:
13 ISSN 0103-4235.
14
- 15 BAYRAM, O.A. et al. Spray drying of sumac flavour using
16 sodium chloride, sucrose, glucose and starch as carriers. *Journal of Food Engineering*, v.69, n.2, p.253-269, 2005.
17 Available from: <[http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877404003620)
18 [S0260877404003620](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877404003620)>. Accessed: May 14, 2013. doi: 10.1016/j.
19 [jfoodeng](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877404003620).2004.08.012.
20
- 21 CABALLERO, B. et al. *Encyclopedia of food sciences and
22 nutrition*. 2.ed. New York: Academic, 2003. 6000 p.
23
- 24 CALVO, P. et al. Influence of the microencapsulation on
25 the quality parameters and shelf-life of extra-virgin olive oil
26 encapsulated in the presence of BHT and different capsule wall
27 components. *Food Research International*, v.45, n.1, p.256-261,
28 2012. Available from: <[http://www.sciencedirect.com/science/](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096399691100617X)
29 [article/pii/S096399691100617X](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096399691100617X)>. Accessed: May 21, 2013. doi:
30 10.1016/j.foodres.2011.10.036.
31
- 32 CHAMPAGNE C.P.; FUSTIER P. Microencapsulation for the improved
33 delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in
34 Biotechnology*, v.18, n.2, p.184-190, 2007. Available from: <[http://](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166907000328)
35 www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166907000328>.
36 Accessed: Jul. 05, 2012. doi: 10.1016/j.copbio.2007.03.001.
37
- 38 CHEN, G.; WANG, W. Role of freeze drying in nanotechnology.
39 *Drying Technology*, v.25, n.1, p.29-35, 2007. Available from:
40 <[http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/073739306011611](http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07373930601161179)
41 [79](http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07373930601161179)>. Accessed: Jun. 19, 2012. doi: 10.1080/07373930601161179.
42
- 43 COMUNIAN, T.A. et al. Microencapsulation of ascorbic acid
44 by complex coacervation: Protection and controlled release.
45 *Food Research International*, v.52, n.1, p.373-379, 2013.
46 Available from: <[http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913001919)
47 [S0963996913001919](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913001919)>. Accessed: May 15 2013. doi: 10.1016/j.
48 [foodres](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913001919).2013.03.028.
49
- 50 DESAI, K.G.H.; PARK, H.J. Recent developments in
51 microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, v.23,
52 n.7, p.1361-1394, 2005. Available from: <[http://www.tandfonline.](http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/DRT-200063478#preview)
53 [com/doi/abs/10.1081/DRT-200063478#preview](http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/DRT-200063478#preview)>. Accessed: Jun.
54 12, 2012. doi: 10.1081/DRT-200063478.
55
- 56 DRUSCH, S. et al. Physicochemical characterization and oxidative
57 stability of fish oil encapsulated in an amorphous matrix containing
58 trehalose. *Food Research International*, v.39, n.7, p.807-815,
59 2006. Available from: <[http://www.sciencedirect.com/science/](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996906000500)
60 [article/pii/S0963996906000500](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996906000500)>. Accessed: May 11, 2013. doi:
61 10.1016/j.foodres.2006.03.003.
62
- 63 EZHILARASI, P.N. et al. Freeze drying technique for
64 microencapsulation of Garcinia fruit extract and its effect on bread
65 quality. *Journal of Food Engineering*, v.117, n.4, p.513-520,
66 2013. Available from: <[http://www.sciencedirect.com/science/](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877413000228)
1 [article/pii/S0260877413000228](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877413000228)>. Accessed: Oct. 15, 2013. doi:
2 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.009.
3
- 4 FÁVARO-TRINDADE, C.S et al. Revisão: microencapsulação de
5 ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*,
6 v.11, n.2, p.103-112, 2008. Available from: <[http://bjft.ital.sp.gov.](http://bjft.ital.sp.gov.br/artigos/html/busca/PDF/v11n2318a.pdf)
7 [br/artigos/html/busca/PDF/v11n2318a.pdf](http://bjft.ital.sp.gov.br/artigos/html/busca/PDF/v11n2318a.pdf)>. Accessed: May 23,
8 2012. doi: ISSN 1519-0900.
9
- 10 FRASCARELI, E.C. et al. Effect of process conditions on the
11 microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food and Bioproducts
12 Processing*, v.90, n.3, p.413-424, 2012. Available from: <[http://www.](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308511001106)
13 [sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308511001106](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308511001106)>. Accessed:
14 May 23, 2013. doi: 10.1016/j.fbp.2011.12.002.
15
- 16 FREITAS, S. et al. Microencapsulation by solvent extraction/
17 evaporation: reviewing the state of the art of microsphere
18 preparation process technology. *Journal of Controlled Release*,
19 v.102, n.2, p.313-332, 2005. Available from: <[http://www.](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365904004845)
20 [sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365904004845](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365904004845)>.
21 Accessed: Jul. 23, 2012. doi: 10.1016/j.jconrel.2004.10.015.
22
- 23 GAMBOA, O.D. et al. Microencapsulation of tocopherols in lipid
24 matrix by spray chilling method. *Procedia Food Science*, v.1,
25 p.1732-1739, 2011. Available from: <[http://www.sciencedirect.](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211601X11002562)
26 [com/science/article/pii/S2211601X11002562](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211601X11002562)>. Accessed: May
27 16, 2013. doi: 10.1016/j.profoo.2011.09.255.
28
- 29 GHARSALLAOUI, A. et al. Applications of spray-drying in
30 microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Research
31 International*, v.40, n.9, p.1107-1121, 2007. Available from: <[http://](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996907001238)
32 www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996907001238>.
33 Accessed: Jul. 10, 2012. doi: 10.1016/j.foodres.2007.07.004.
34
- 35 GHARSALLAOUI, A. et al. Properties of spray-dried food
36 flavours microencapsulated with two-layered membranes: Roles of
37 interfacial interactions and water. *Food Chemistry*, v.132, n.4,
38 p.1713-1720, 2012. Available from: <[http://www.sciencedirect.](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611004092)
39 [com/science/article/pii/S0308814611004092](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611004092)>. Accessed: May 15,
40 2013. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.03.028.
41
- 42 GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of
43 existing technologies and trends. *Trends in Food Science and
44 Technology*, v.15, n.7-8, p.330-347, 2004. Available from: <[http://](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224403002723)
45 www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224403002723>.
46 Accessed: Jun. 16, 2012. doi: 10.1016/j.tifs.2003.10.005.
47
- 48 GRATTARD, N. et al. Influence of physical state and molecular
49 mobility of freeze-dried maltodextrin matrices on the oxidation rate
50 of encapsulated lipids. *Journal of Food Science*, v.67, n.8, p.3002-
51 3010, 2002. Available from: <[http://onlinelibrary.wiley.com/](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08851.x/abstract)
52 [doi/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08851.x/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08851.x/abstract)>. Accessed:
53 May 17, 2013. doi: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb08851.x.
54
- 55 HICKEY, D.K. et al. Lipolysis in cheddar cheese made from raw,
56 thermized, and pasteurized milks. *Journal of Dairy Science*, v.90,
57 n.1, p.47-56, 2007. Available from: <[http://www.sciencedirect.](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030207726073)
58 [com/science/article/pii/S0022030207726073](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030207726073)>. Accessed: May
59 18, 2013. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(07)72607-3.
60
- 61 JUN-XIA, X. et al. Microencapsulation of sweet orange oil by
62 complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food
63 Chemistry*, v.125, n.4, p.1267-1272, 2011. Available from: <[http://](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610013191)
64 www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610013191>.
65 Accessed: May 13, 2013. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.10.063.
66

- 1 KAILASAPATHY, K.; LAM, S.H. Application of encapsulated
2 enzymes to accelerate cheese ripening. **International Dairy**
3 **Journal**, v.15, n.6-9, p.929-939, 2005. Available from: <[http://](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694604002912)
4 www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694604002912>.
5 Accessed: May 10, 2013. doi: 10.1016/j.idairyj.2004.11.006.
6
- 7 KHAN, M.I. et al. Meat as a functional food with special reference
8 to probiotic sausages. **Food Research International**, v.44, n.10,
9 p.3125-3133, 2011. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911004819>>. Accessed: May 15,
10 2013. doi: 10.1016/j.foodres.2011.07.033.
11
- 12 KRISHNAN, S. et al. Microencapsulation of cardamom oleoresin:
13 evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified
14 starch as wall materials. **Carbohydrate Polymers**, v.61, n.1,
15 p.95-102, 2005. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861705001086>>. Accessed: May 20,
16 2013. doi: 10.1016/j.carbpol.2005.02.020.
17
- 18 LAOHASONGKRAM, K. et al. Microencapsulation of
19 Macadamia oil by spray drying. **Procedia Food Science**, v.1,
20 p.1660-1665, 2011. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211601X1100246X>>. Accessed: May
21 17, 2013. doi: 10.1016/j.profoo.2011.09.245.
22
- 23 MADENE, A. et al. Flavor encapsulation and controlled release - a
24 review. **International Journal of Food Science and Technology**,
25 v.41, n.1, p.1-21, 2006. Available from: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2005.00980.x/full>>. Accessed: Jul.
26 04, 2012. doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.00980.x.
27
- 28 MARQUES, L.G. et al. Freeze-drying characteristics of
29 tropical fruits. **Drying Technology**, v.24, n.4, p.457-463, 2006.
30 Available from: <[http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/](http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07373930600611919#preview)
31 [07373930600611919#preview](http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07373930600611919#preview)>. Accessed: Jul. 03, 2012. doi:
32 10.1080/07373930600611919.
33
- 34 MIRZAEI, H. et al. Effect of calcium alginate and resistant
35 starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus*
36 *acidophilus* La5 and sensory properties in Iranian white brined cheese.
37 **Food Chemistry**, v.132, n.4, p.1966-1970, 2012. Available from: <[http://](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611017882)
38 www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611017882>.
39 Accessed: May 17, 2013. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.12.033.
40
- 41 NAZZARO, F. et al. Microencapsulation in food science and
42 biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.23, n.2,
43 p.182-186, 2012. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166911006847>>. Accessed: Jul. 02,
44 2012. doi: 10.1016/j.copbio.2011.10.001.
45
- 46 OLIVEIRA, A.C. et al. Stability of microencapsulated *B. lactis*
47 (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation
48 followed by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, v.24,
49 n.7, p.685-693, 2007. Available from: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/02652040701532908>>. Accessed: Jul. 05,
50 2012. doi: 10.1080/02652040701532908.
51
- 52 OLIVEIRA, M.N. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos
53 funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências**
54 **Farmacêuticas**, v.38, n.1, p.1-21, 2002. Available from: <[http://](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322002000100002&lang=pt)
55 [www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322002000100002&lang=pt)
56 [93322002000100002&lang=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322002000100002&lang=pt)>. Accessed: May 17, 2013. doi:
57 10.1590/S1516-93322002000100002.
58
- 59 PARK, D.; MAGA, J.A. Identification of key volatiles
60 responsible for odour quality differences in popped popcorn of
61 selected hybrids. **Food Chemistry**, v.99, n.3, p.538-545, 2006.
62 Available from: <[http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605006904)
63 [S0308814605006904](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605006904)>. Accessed: May 25, 2013. doi: 10.1016/j.
64 foodchem.2005.08.019.
65
- 66 RATHORE, S. et al. Microencapsulation of microbial cells.
Journal of Food Engineering, v.116, n.2, p.369-381, 2013.
Available from: <[http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877412006103)
[S0260877412006103](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877412006103)>. Accessed: Jul. 10, 2013. doi: 10.1016/j.
jfoodeng.2012.12.022.
- ROBERTS, D.D.; TAYLOR, A.J. **Flavor release**. Washington:
American Chemical Society, 2000. 496 p.
- ROCHA-SELMÍ, G.A. et al. Microencapsulation of aspartame
by double emulsion followed by complex coacervation to provide
protection and prolong sweetness. **Food Chemistry**, v.139, n.1-
4, p.72-78, 2013. Available from: <[http://www.sciencedirect.com/](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613001507)
[science/article/pii/S0308814613001507](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613001507)>. Accessed: May 13,
2013. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.01.114.
- ROSEN, R.M. **Delivery system handbook for personal care and
cosmetic products**. Technology, applications and formulations.
New York: William Andrew, 2006. 1095 p.
- SANGUANSRI, P.; AUGUSTIN, M.A. Nanoscale materials
development. A food industry perspective. **Trends in Food Science
and Technology**, v.17, n.10, p.547-556, 2006. Available from: <[http://](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224406001919)
www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224406001919>.
Accessed: Dec. 12, 2012. doi: 10.1016/j.tifs.2006.04.010.
- SILVA, C. et al. Administração oral de peptídeos e proteínas:
II. aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista
Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, n.1, p.1-20, 2003.
Available from: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-93322003000100002&script=sci_arttext)
[93322003000100002&script=sci_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-93322003000100002&script=sci_arttext)>. Accessed: Jun. 19,
2012. doi: 10.1590/S1516-93322003000100002.
- SONG, H. et al. Microencapsulated probiotics using
emulsification technique coupled with internal or external gelation
process. **Carbohydrate Polymers**, v.96, n.1, p.181-189, 2013.
Available from: <[http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861713003184)
[S0144861713003184](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861713003184)>. Accessed: Sept. 10, 2013. doi: 10.1016/j.
carbpol.2013.03.068.
- SUAVE, J. et al. Microencapsulação: inovação em diferentes
áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v.7, n.2, p.12-20, 2006.
Available from: <[http://periodicos.univille.br/index.php/RSA/](http://periodicos.univille.br/index.php/RSA/article/view/86/136)
[article/view/86/136](http://periodicos.univille.br/index.php/RSA/article/view/86/136)>. Accessed: Jul. 05, 2012. doi: ISSN
2175-1641.
- SWARBRICK, J. **Encyclopedia of pharmaceutical technology**.
2.ed. New York: Informa Healthcare, 2004. 5536 p.
- TOLDRA, F.; REIG, M. Innovations for healthier processed meats.
Trends in Food Science & Technology, v.22, n.9, p.517-522,
2011. Available from: <[http://www.sciencedirect.com/science/](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224411001580)
[article/pii/S0924224411001580](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224411001580)>. Accessed: May 20, 2013. doi:
10.1016/j.tifs.2011.08.007.
- WEGMULLER, R. et al. Development, stability, and sensory
testing of microcapsules containing iron, iodine and vitamin A
for use in food fortification. **Journal of Food Science**, v.71, n.2,
p.181-187, 2006. Available from: <[http://onlinelibrary.wiley.com/](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2006.tb08923.x/abstract)
[doi/10.1111/j.1365-2621.2006.tb08923.x/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2006.tb08923.x/abstract)>. Accessed: May
09, 2013. doi: 10.1111/j.1365-2621.2006.tb08923.x.

- 1 WONG, S.W. et al. Characterising the release of flavour
2 compounds from chewing gum through HS-SPME analysis and
3 mathematical modeling. **Food Chemistry**, v.114, n.3, p.852-858,
4 2009. Available from: <[http://www.sciencedirect.com/science/
5 article/pii/S0308814608012442](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608012442)>. Accessed: May 19, 2013. doi:
6 10.1016/j.foodchem.2008.10.030.
- 7
8 YULIANI, S. et al. Extrusion of mixtures of starch and D-limonene
9 encapsulated with β -cyclodextrin: Flavour retention and physical
properties. **Food Research International**, v.39, n.3, p.318-331, 1
2006. Available from: <[http://www.sciencedirect.com/science/
3 article/pii/S0963996905001894](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996905001894)>. Accessed: Oct. 15, 2013. doi:
4 10.1016/j.foodres.2005.08.005.
- 5
6 ZANETTI, B.G. **Desenvolvimento de microesferas de**
7 **carbamazepina visando ao prolongamento da liberação do**
8 **fármaco.** 2001. 100f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) -
9 Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

2.2 Artigo 1

MICROENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS POR *SPRAY DRYING*: AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA SOB CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS E DA VIABILIDADE SOB DIFERENTES TEMPERATURAS DE ARMAZENAMENTO

**Pablo Teixeira da Silva^{I*}, Leadir Lucy Martins Fries^I, Cristiano Ragagnin de Menezes^I,
Juliana de Oliveira Bastos^I, Cristiane de Bona da Silva^{II}, Mariana Heldt Motta^{II},
Roseane Fagundes Ribeiro^{II}, Hilda Hildebrand Soriani^{III}**

Artigo aceito pela Revista Ciência Rural, em 14/10/14.

Ciência Rural - Decision on Manuscript ID CR-2014-0211.R1



rudiweiblen@gmail.com 14/10/2014 ▶

Para: pabloteixeiras@hotmail.com

Cc: pabloteixeiras@hotmail.com, lucymicro@yahoo.com.br, cristiano.ufsm@gmail.com, cristie.bona@gmail.com, hildahs@usp.br, juh.bastos@...

14-Oct-2014

Dear Prof. Silva:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Microencapsulação de probióticos por *spray drying*: avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento"

Your paper has been approved provisionally and may still need some corrections or additional information after it has been verified by our staff. So we will contact you in the near future with the suggestions and before the paper is published in the *Ciência Rural*. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the *Ciência Rural*, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Rudi Weiblen
Editor-in-Chief, *Ciência Rural*
rudiweiblen@gmail.com

^(I) Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, nº 1000, CEP: 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: pabloteixeiras@hotmail.com. * Autor para correspondência.

^(II) Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, nº 1000, CEP: 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

^(III) Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, nº 1000, CEP: 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Microencapsulação de probióticos por *spray drying*: avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento

Microencapsulation of probiotics by spray drying: evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and availability under different storage temperatures

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar microcápsulas contendo *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus* produzida por *spray drying*. Ensaio de sobrevivência foram conduzidos para avaliar a resistência dos probióticos a condições gastrointestinais simuladas e a sua viabilidade durante 120 dias de armazenamento a 4°C e 25°C, além da análise morfológica das microcápsulas. A microencapsulação protegeu os probióticos das condições gastrointestinais simuladas, os quais permaneceram viáveis após 120 dias de armazenamento a 4°C e 25°C, sendo mais viáveis a 4°C. As microcápsulas apresentaram forma esférica, com superfície contínua relativamente lisa e sem fissuras. O estudo indica que microcápsulas de *B. animalis* e *L. acidophilus* produzidas por *spray drying* sobrevivem a condições gastrointestinais simuladas e podem ser melhores armazenadas por 120 dias a 4°C.

Palavras-chave: *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus*, microcápsulas.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate microcapsules containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* by spray drying. Survival assays were conducted to evaluate the resistance of probiotics to simulated gastrointestinal conditions and its availability during 120 days of storage at 4°C and 25°C, besides to morphological analysis of the microcapsules. Microencapsulation protected the probiotics from simulated

gastrointestinal conditions, which also remained viable after 120 days of storage at 4°C and 25°C, but more viable at 4°C. The microcapsules showed spherical shape with relatively smooth continuous surface without cracks. The study indicates that microcapsules of *B. animalis* or *L. acidophilus* by spray drying survive in simulated gastrointestinal conditions and can be better stored for 120 days at 4°C.

Key words: *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus*, microcapsules.

INTRODUÇÃO

A conscientização da população quanto à necessidade do consumo de alimentos mais saudáveis fez com que, nos últimos anos, houvesse um aumento no interesse do uso de probióticos em alimentos (COSTA & ROSA, 2010).

Os probióticos são definidos como micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002), dentre os quais podemos destacar a prevenção de câncer de cólon; o aumento da resposta imune; o melhor trânsito intestinal; a redução de episódios de diarreia; a redução do colesterol sanguíneo e o alívio dos sintomas de intolerância à lactose (WEICHERT et al., 2012). Entretanto, para que os probióticos tenham sua ação eficaz, tem sido sugerido que os produtos devam conter pelo menos 6 log UFC.g⁻¹ de micro-organismos vivos no momento do consumo (CHÁVEZ & LEDEBOER, 2007). Diferentemente de BRASIL (2008), que estabelece o limite mínimo de 8 log UFC.g⁻¹ com base na porção diária de alimento. Além disso, os probióticos devem sobreviver a um ambiente totalmente adverso, o trato gastrointestinal, tolerando ácidos, sais biliares e enzimas. Dessa forma, a microencapsulação tem sido estudada como uma alternativa para manter a viabilidade destes micro-organismos (YING et al., 2013).

A microencapsulação é uma técnica de encapsulação de substâncias ativas através de uma agente encapsulante, o qual as protege do ambiente adverso, evitando o efeito de sua exposição inadequada. O agente encapsulante forma uma cápsula que se desfaz através de estímulo específico, liberando as substâncias ativas no local ideal (SOHAIL et al., 2011).

Alguns métodos têm sido usados para encapsulação de probióticos, dentre eles pode-se destacar o método por *spray drying*. Este método envolve a atomização de uma emulsão ou de uma suspensão de probióticos e agentes de encapsulação em uma câmara de secagem por ar quente, resultando na rápida evaporação de água. As vantagens do método por *spray drying* são a sua rapidez e custo relativamente baixo. A técnica é altamente reprodutível e sua característica mais importante consiste na sua adequação para aplicações industriais (BURGAIN et al., 2011).

O objetivo do presente trabalho foi encapsular *B. animalis* e *L. acidophilus* por *spray drying* e avaliar a sobrevivência dos probióticos sob condições gastrointestinais simuladas e a viabilidade durante 120 dias de armazenamento a 4°C e 25°C, além da análise morfológica das microcápsulas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Ativação e produção do concentrado de micro-organismos probióticos

As culturas liofilizadas de *B. animalis* (BB12) e *L. acidophilus* (LA05) (Christian Hansen) foram ativadas, em caldo MRS e leite em pó integral 10% esterilizado, respectivamente, ambas a 37°C, por 24 horas. Os desenvolvimentos bacterianos foram submetidos à centrifugação a 4670 g, a 4°C por 15 minutos e os precipitados foram lavados em solução salina (0,85%) e centrifugados novamente por duas vezes (LISERRE et al. 2007).

Microencapsulação e contagem dos probióticos

Para a formulação do material de parede foram utilizados os seguintes agentes encapsulantes: acetato ftalato de celulose, glicerol, leite em pó integral, maltodextrina,

trehalose, frutoligossacarídeo, hi-maize 260 e Tween 80. Os agentes encapsulantes foram dissolvidos em solução tampão fosfato salino 0,05M pH 7,6, sob agitação. Ao final da dissolução foi adicionado 1% dos probióticos ativados e centrifugados de *B. animalis* e *L. acidophilus*, separadamente, obtendo duas formulações (FÁVARO-TRINDADE & GROSSO, 2000).

Para a microencapsulação foi utilizado um mini *spray dryer* LM, modelo MSD 1.0. As formulações probióticas secas foram coletadas do ciclone, colocadas em frascos de vidro hermeticamente fechados e armazenadas em dessecadores contendo solução saturada LiCl, dentro de uma incubadora (25°C) e sob refrigeração (4°C).

A viabilidade das culturas de *B. animalis* e *L. acidophilus* foi determinada pela contagem das microcápsulas. As microcápsulas foram desintegradas em solução tampão fosfato salino 0,05M pH 7,6, na proporção de 0,01 g·mL⁻¹. A solução tampão com as microcápsulas foram submetidas à agitação de 150 rpm, a 37°C por 5 minutos. Após a desintegração, os micro-organismos foram liberados e enumerados (GROSSO & FÁVARO-TRINDADE, 2004). A enumeração foi realizada em ágar MRS pela técnica de semeadura em profundidade e incubação a 37°C, em anaerobiose (GaspakTM EZ Anaerobe, BD), por 72 horas (VIDEROLA & REINHEIMER, 2000).

A avaliação da viabilidade dos probióticos durante o armazenamento foi realizada para determinar o prazo de validade das microcápsulas obtidas. As contagens ocorreram após 1, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 dias de armazenamento a 4°C e 25°C.

Sobrevivência dos probióticos às condições gastrointestinais simuladas

A sobrevivência das microcápsulas de *B. animalis* e *L. acidophilus* submetida às condições gastrointestinais simuladas foram avaliadas de acordo com método descrito por LISERRE et al. (2007), com modificações. Separadamente, alíquotas de 5 g de microcápsulas desidratadas de *B. animalis* e *L. acidophilus* foram adicionadas de HCl 1M até atingir pH de

1,4-1,9 e de soluções de pepsina (P7000, Sigma-Aldrich) e lipase (L3126, Sigma-Aldrich) até a obtenção de concentração de $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e de $0,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. As amostras foram incubadas a 37°C , sob agitação contínua, durante 2 horas. Na etapa seguinte, o pH das amostras foi aumentado para 4,3-5,2, usando uma solução alcalina (150 mL de NaOH 1M, 12,38 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ e água destilada até 1 L). Bile (B8381, Sigma-Aldrich) e pancreatina (P3292, Sigma-Aldrich) foram adicionadas até a obtenção de uma concentração de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e de $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. As amostras foram incubadas novamente a 37°C por 2 horas, sob agitação contínua. Na última etapa, o pH foi aumentado para 6,7-7,5 usando a mesma solução alcalina descrita acima. As concentrações de bile e pancreatina foram ajustadas para $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, e as amostras foram incubadas novamente a 37°C por 2 horas sob agitação contínua, finalizando um total de 6 horas de análise. As contagens foram realizadas após 30 minutos, 2 horas, 4 horas e 6 horas de incubação.

Análise morfológica das microcápsulas

As amostras foram fixadas em suportes de alumínio, com auxílio de fita carbono dupla face e metalizadas em metalizador de fluxo iônico DENTON, modelo Desk II. A análise morfológica das microcápsulas foi obtida através de imagens de microscópio eletrônico de varredura JEOL, modelo JSM 6360.

Análise estatística

Os dados foram avaliados através de Análise de Variância (ANOVA), sendo que as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$), utilizando o *software* SAS (*Statistic Analysis System*, versão 9).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da viabilidade dos probióticos microencapsulados durante armazenamento

O dano celular e a perda de atividade podem ocorrer durante o processamento e/ou armazenamento dos micro-organismos. Portanto, a microencapsulação adequada assegura que

os micro-organismos sobrevivam ao processamento e que permaneçam viáveis durante o armazenamento (OLIVEIRA et al., 2007).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, houve diferença significativa tanto para *B. animalis* quanto para *L. acidophilus* armazenados a 4°C e 25°C, durante os 120 dias de análises, verificando um decréscimo nas contagens com o passar dos dias. Isso pode ser explicado, pois os micro-organismos são metabolicamente ativos dentro das microcápsulas, produzindo ácidos metabólicos e bacteriocinas e/ou a perda de substratos (PEDROSO et al., 2012). Entretanto, ao final dos 120 dias, as contagens foram superiores a 6 log UFC.g⁻¹, sendo este o mínimo aceitável para efeito probiótico em produtos (ROY, 2005). Contrariamente à BRASIL (2008), que estabelece o limite mínimo de 8 log UFC.g⁻¹ com base na porção diária de alimento. De acordo com RODRIGUES et al. (2011), a umidade relativa elevada, a alta temperatura e longos períodos de armazenamento são prejudiciais para a sobrevivência de probióticos.

Também pode ser verificado na Tabela 1, que houve diferença significativa quando da comparação de *B. animalis* e *L. acidophilus* armazenados a 4°C com 25°C. Resultados semelhantes foram encontrados por OKURO et al. (2013). Estes resultados sugerem que a estabilidade dos probióticos microencapsulados aumenta com a diminuição da temperatura. Tal fenômeno ocorre, pois os micro-organismos são mantidos num estado latente, evitando rearranjos no material de parede, impedindo, dessa forma, a exposição inadequada dos micro-organismos, promovendo um aumento da vida útil das microcápsulas (ALBERTINI et al., 2010). Temperaturas próximas a 0°C melhoram os índices de viabilidade celular, pois temperaturas mais baixas reduzem as taxas de reações químicas que são prejudiciais para os micro-organismos, tais como oxidação (NAG et al., 2011).

Sobrevivência dos probióticos às condições gastrointestinais simuladas

Um dos principais problemas dos probióticos é a baixa taxa de sobrevivência destes em pH gástrico e altas concentrações de sais biliares no intestino (SABIKHI et al., 2010), o que pode ser verificado na Figura 1, onde *B. animalis* e *L. acidophilus* livres não resistiram às condições gastrointestinais simuladas, não havendo contagem de ambos após 120 e 240 minutos de incubação, respectivamente. PÁEZ et al. (2012) e RANADHEERA et al. (2012) obtiveram resultados semelhantes.

O mesmo não foi verificado nos micro-organismos *B. animalis* e *L. acidophilus* encapsulados, Figura 1, onde após 360 minutos de incubação possuíam 9,86 e 9,03 log UFC·g⁻¹, respectivamente, demonstrando que a microencapsulação protege os micro-organismos das condições gastrointestinais simuladas. A baixa contagem após 30 minutos de incubação e crescimento posterior deve-se a utilização de acetato ftalato de celulose como material de parede, o qual é gastrorresistente, ou seja, somente dissolve-se em pH acima de 6,0, retardando a liberação dos micro-organismos probióticos. A liberação será sempre no intestino e não no estômago, promovendo proteção aos micro-organismos probióticos durante o trânsito gastrointestinal (HEIDEBACH et al., 2012). Estudos de GEBARA et al. (2013), confirmam o aumento da resistência de probióticos microencapsulados quando expostos às condições gastrointestinais simuladas, comparando com a sobrevivência de células livres.

Análise morfológica das microcápsulas

As imagens capturadas através de microscopia eletrônica de varredura, Figura 2, demonstraram a forma esférica das microcápsulas, com superfície contínua relativamente lisa, sem fissuras ou poros pronunciados, o que facilita o escoamento e a dispersão do material. Microcápsulas semelhantes foram encontradas por FÁVARO-TRINDADE & GROSSO (2002).

CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a microencapsulação de *B. animalis* ou *L. acidophilus* por *spray drying*, produziu microcápsulas esféricas e sem fissuras, que foram eficientes na proteção dos micro-organismos contra condições gastrointestinais simuladas. Além disso, podendo ser armazenados, com melhores resultados, a 4°C por 120 dias.

REFERÊNCIAS

- ALBERTINI, B. et al. Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, n.4, p.359-366, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098710001569>>. Acesso em: 28 jan. 2014. doi: 10.1016/j.ejps.2010.04.011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, 09 de janeiro de 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 07 jan. 2014.
- BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v.104, n.4, p.467-483, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026087741000631X>>. Acesso em: 06 jan. 2014. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031.
- CHÁVEZ, B.E.; LEDEBOER, A.M. Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. **Drying Technology**, v.25, n.7-8, p.1193-1201, 2007.

Disponível

em:

<<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07373930701438576#.UtUtYPRDvT8>>.

Acesso em: 07 jan. 2014. doi: 10.1080/07373930701438576.

COSTA, N.M.B.; ROSA, C.O.B. **Alimentos funcionais. Componentes biotivos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010. 560 p.

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. The effect of the immobilization of *L. acidophilus* and *B. lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions.

Milchwissenschaft, v.55, n.9, p.496-499, 2000. Disponível em:

<<http://www.cabdirect.org/abstracts/20000406005.html>>. Acesso em: 06 jan. 2014. ISSN: 0026-3788.

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and

in bile. **Journal of Microencapsulation**, v.19, n.4, p.485-494, 2002. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12396385>>. Acesso em: 28 jan. 2014. doi: 10.1080/02652040210140715.

GEBARA, C. et al. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research**

International, v.51, n.2, p.872-878, 2013. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913001014>>. Acesso em: 06 jan. 2014. doi: 10.1016/j.foodres.2013.02.008.

GROSSO, C.R.F.; FÁVARO-TRINDADE, C.S. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B.*

lactis in yoghurt. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, n.1-2, p.151-156, 2004.

Disponível

em:

<<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517->

[83822004000100025&script=sci_arttext](#)>. Acesso em: 06 jan. 2014. doi: 10.1590/S1517-83822004000100025.

HEIDEBACH, T. et al. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.52, n.4, p.291-311, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22332594>>. Acesso em: 06 jan. 2014. doi: 10.1080/10408398.2010.499801.

LISERRE, A.M. et al. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, v.21, n.1, p.1-16, 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08905430701191064#.UtZvRvRDvT8>>.

Acesso em: 06 jan. 2014. doi: 10.1080/08905430701191064.

NAG, A. et al. Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodium caseinate and gellan gum. **International Dairy Journal**, v.21, n.4, p.247-253, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694610002505>>.

Acesso em: 06 jan. 2014. doi: 10.1016/j.idairyj.2010.11.002.

OKURO, P.K. et al. Co-encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. **Food Research International**, v.53, n.1, p.96-103, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913002172>>. Acesso em: 27 jan. 2014. doi: 10.1016/J.FOODRES.2013.03.042.

OLIVEIRA, A.C. et al. Microencapsulation of *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spouted-bed drying. **Drying Technology**, v.25, n.10, p.1687-1693, 2007. Disponível em:

<<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07373930701590939#.UuaCaxBTvDc>>.

Acesso em: 27 jan. 2014. doi: 10.1080/07373930701590939.

- PÁEZ, R. et al. Effect of heat treatment and spray drying on lactobacilli viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v.48, n.2, p.748-754, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996912002104>>. Acesso em: 28 jan. 2014. doi: 10.1016/j.foodres.2012.06.018.
- PEDROSO, D.L. et al. Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. **International Dairy Journal**, v.26, n.2, p.127-132, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694612001021>>. Acesso em: 27 jan. 2014. doi: 10.1016/j.idairyj.2012.04.008.
- RANADHEERA, C.S. et al. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, v.49, n.2, p.619-625, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996912003663>>. Acesso em: 27 jan. 2014. doi: 10.1016/j.foodres.2012.09.007.
- RODRIGUES, D. et al. Influence of L-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. **International Dairy Journal**, v.21, n.11, p.869-876, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095869461100152X>>. Acesso em: 06 jan. 2014. doi: 10.1016/j.idairyj.2011.05.005.
- ROY, D. Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. **Lait**, v.85, n.1-2, p.39-56, 2005. Disponível em: <<http://hal.archives-ouvertes.fr/docs/00/89/55/93/PDF/hal-00895593.pdf>>. Acesso em: 07 jan. 2014. doi: 10.1051/lait:2004026.

SABIKHI, L. et al. Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. **Food and Bioprocess Technology**, v.3, n.4, p.586-593, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11947-008-0135-1>>. Acesso em: 27 jan. 2014. doi: 10.1007/s11947-008-0135-1.

SOHAIL, A. et al. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. **International Journal of Food Microbiology**, v.145, n.1, p.162-168, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160510006975>>. Acesso em: 06 jan. 2014. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.007.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v.10, n.4, p.271-275, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694600000455>>. Acesso em: 06 jan. 2014. doi: 10.1016/S0958-6946(00)00045-5.

WEICHERT, S. et al. The role of prebiotics and probiotics in prevention and treatment of childhood infectious diseases. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v.31, n.8, p.859-862. 2012. Disponível em: <[http://journals.lww.com/pidj/Documents/Prebiotics and Probiotics%20ESPID%20Aug%2012.pdf](http://journals.lww.com/pidj/Documents/Prebiotics_and_Probiotics%20ESPID%20Aug%2012.pdf)>. Acesso em: 07 jan. 2014. doi: 10.1097/INF.0b013e3182620e52.

YING, D. et al. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein and resistant starch matrices: Probiotic survival in fruit juice. **Journal of Functional Foods**, v.5, n.1, p.98-105, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464612001351>>. Acesso em: 06 jan. 2014. doi: 10.1016/j.jff.2012.08.009.

Tabela 1 – Viabilidade das microcápsulas ($\log \text{UFC.g}^{-1}$) de *B. animalis* e *L. acidophilus* armazenadas durante 120 dias sob diferentes temperaturas.

Micro-organismos	Tempo (dias)	Temperatura de armazenamento	
		4°C	25°C
<i>B. animalis</i>	1	11,87 \pm 0,06 ^{Aa}	11,87 \pm 0,06 ^{Aa}
	20	10,92 \pm 0,08 ^{Ba}	10,68 \pm 0,07 ^{Bb}
	40	10,04 \pm 0,15 ^{Ca}	9,61 \pm 0,11 ^{Cb}
	60	9,24 \pm 0,09 ^{Da}	8,65 \pm 0,10 ^{Db}
	80	8,50 \pm 0,12 ^{Ea}	7,78 \pm 0,15 ^{Eb}
	100	7,82 \pm 0,07 ^{Fa}	7,00 \pm 0,12 ^{Fb}
	120	7,20 \pm 0,09 ^{Ga}	6,30 \pm 0,11 ^{Gb}
<i>L. acidophilus</i>	1	11,52 \pm 0,09 ^{Aa}	11,52 \pm 0,09 ^{Aa}
	20	10,60 \pm 0,11 ^{Ba}	10,37 \pm 0,06 ^{Bb}
	40	9,75 \pm 0,08 ^{Ca}	9,33 \pm 0,10 ^{Cb}
	60	8,97 \pm 0,11 ^{Da}	8,40 \pm 0,08 ^{Db}
	80	8,25 \pm 0,09 ^{Ea}	7,56 \pm 0,11 ^{Eb}
	100	7,59 \pm 0,10 ^{Fa}	6,80 \pm 0,13 ^{Fb}
	120	7,04 \pm 0,08 ^{Ga}	6,12 \pm 0,10 ^{Gb}

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

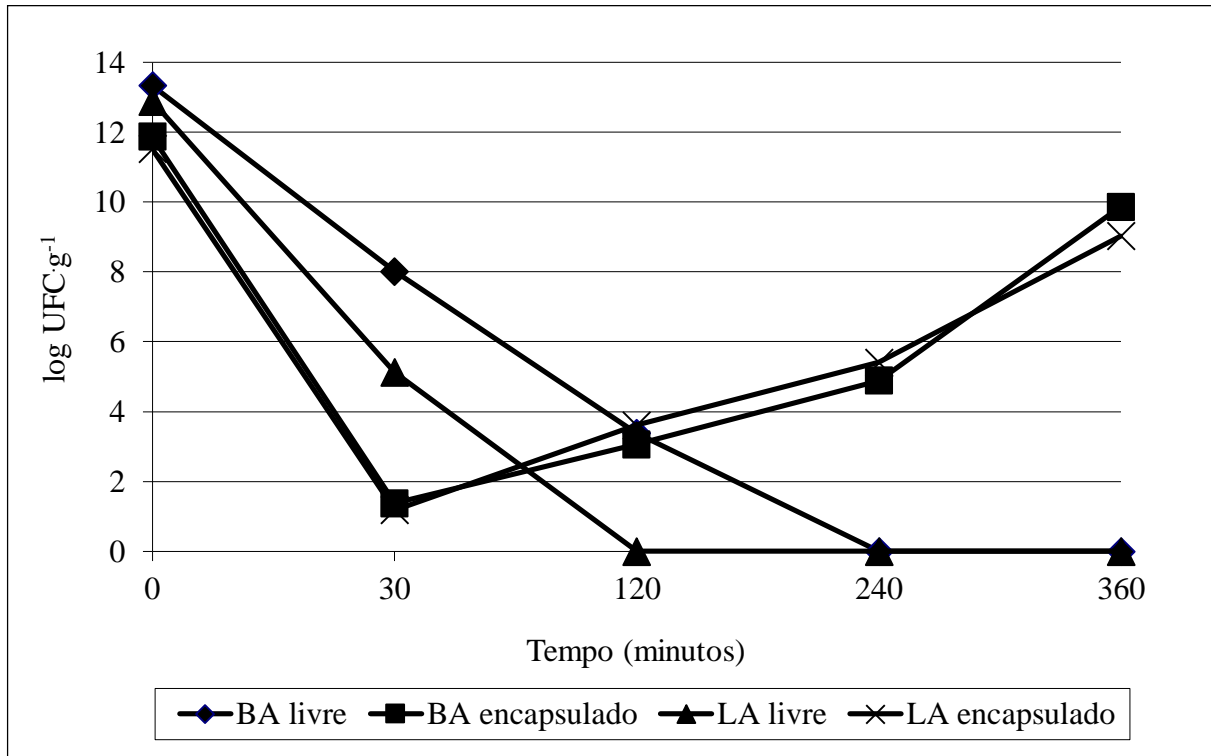


Figura 1 – Sobrevivência dos micro-organismos *B. animalis* (BA) e *L. acidophilus* (LA) livres e encapsulados às condições gastrointestinais simuladas.

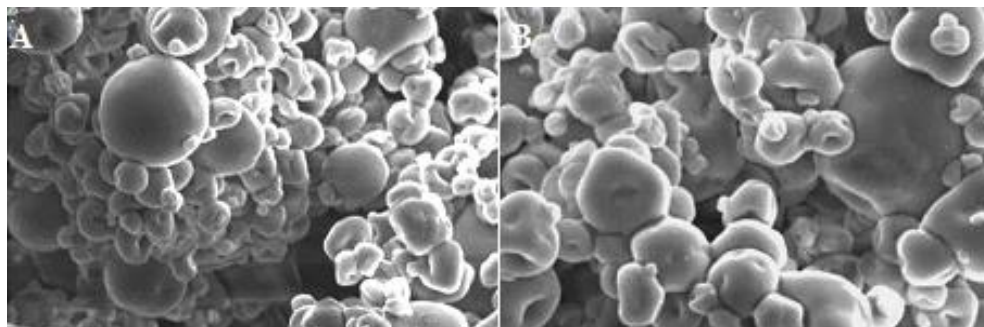


Figura 2 – Imagens do microscópio eletrônico de varredura para microcápsulas de *B. animalis* (A, 2000x) e *L. acidophilus* (B, 2000x).

2.3 Artigo 2

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE MICROCÁPSULAS PROBIÓTICAS ÀS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS E SENSORIAIS DE SALAME TIPO ITALIANO

**Pablo Teixeira da Silva^{I*}, Leadir Lucy Martins Fries^I, Cristiano Ragagnin de Menezes^I,
Juliana de Oliveira Bastos^I, Cristiane de Bona da Silva^{II}, Daniele Juçara Kleovan
Lang^{III}, Janaína de Borba Braga^{III}**

Artigo submetido à Revista Ciência Rural, em 01/05/14.

Ciência Rural - Manuscript ID CR-2014-0668

↑ ↓ ×



vagner.neujahr@gmail.com Adicionar aos contatos 01/05/2014 |▶

Para: pabloteixeiras@hotmail.com

Cc: pabloteixeiras@hotmail.com, lucymicro@yahoo.com.br, cristiano.ufsm@gmail.com, cristie.bona@gmail.com, dani-kl@hotmail.com, borba.bra... ✕

01-May-2014

Dear Prof. Silva:

Your manuscript entitled "Avaliação do efeito da adição de microcápsulas probióticas às características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de salame tipo Italiano" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Ciência Rural.

Your manuscript ID is CR-2014-0668.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <http://mc04.manuscriptcentral.com/cr-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc04.manuscriptcentral.com/cr-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Ciência Rural.

^(I) Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, nº 1000, CEP: 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: pabloteixeiras@hotmail.com. * Autor para correspondência.

^(II) Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, nº 1000, CEP: 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

^(III) Colégio Agrícola de Frederico Westphalen, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Linha Sete de Setembro, s/n, CEP: 98400-000, Frederico Westphalen, Rio Grande do Sul, Brasil.

Avaliação do efeito da adição de microcápsulas probióticas às características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de salame tipo Italiano

Evaluation the effect of the addition of probiotic microcapsules to the physicochemical, microbiological and sensory characteristics of Italian salami

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi adicionar microcápsulas de *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus* à produção de salame tipo Italiano, avaliando seus efeitos sobre as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do salame. Foram produzidos três tratamentos, sendo T1 o controle e T2 e T3 com adição de microcápsulas de *B. animalis* e *L. acidophilus*, respectivamente. Através dos resultados constatou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos com relação às análises de atividade de água, umidade, perda de peso, pH, coliformes à 45°C, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* spp., análise sensorial de comparação múltipla e intenção de compra. Os tratamentos T2 e T3 mantiveram contagens de *B. animalis* e *L. acidophilus* acima de 6 log UFC·g⁻¹ até 90 dias de produção. O estudo indica que a adição de microcápsulas de *B. animalis* ou *L. acidophilus* à produção de salame tipo Italiano não altera as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do salame probiótico, sendo viável durante 90 dias.

Palavras-chave: *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus*, microencapsulação.

ABSTRACT

The aim of this study was to added microcapsules of *Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus acidophilus* to the production of Italian salami, evaluating its effects on the physicochemical, microbiological and sensory characteristics of salami. Three treatments were produced, T1 control and T2 and T3 with the addition of microcapsules of *B. animalis* and *L. acidophilus*, respectively. There were no significant difference between treatments in

relation to water activity, moisture, weight loss, pH, coliform to 45°C, *Staphylococcus* coagulase positive, *Salmonella* spp., multiple comparisons test and purchase intention. The treatments T1 e T2 maintained counts of *B. animalis* and *L. acidophilus* above 6 log CFU·g⁻¹ within 90 days of production. The study indicates that the addition of microcapsules of *B. animalis* or *L. acidophilus* to the production of Italian salami not alter the physicochemical, microbiological and sensory characteristics of the probiotic salami, being viable for 90 days.

Key words: *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus*, microencapsulation.

INTRODUÇÃO

A microencapsulação pode ser definida como a tecnologia de empacotamento de sólidos, líquidos ou gases, com filmes poliméricos, formando pequenas partículas denominadas microcápsulas (GHARSALLAOUI et al., 2007). Dentre as inúmeras aplicações da microencapsulação podemos destacar a de micro-organismos (AZEREDO, 2005).

Os micro-organismos têm sido microencapsulados em alimentos devido ao efeito bactericida do suco gástrico, aumentando, assim, sua viabilidade ao longo do trato gastrointestinal (OLIVEIRA et al., 2007).

Devido ao fato de que os produtos cárneos fermentados são fabricados com carne crua e consumidos sem prévio aquecimento, o uso de probióticos mostra-se promissor (AMMOR & MAYO, 2007). Dessa forma, através da adição de probióticos ao salame seria desenvolvido um novo produto funcional, o qual traria benefícios à saúde do indivíduo, podendo destacar a prevenção de câncer de cólon; o aumento da resposta imune; o melhor trânsito intestinal e a redução do colesterol sanguíneo (WEICHERT et al., 2012).

O objetivo do presente trabalho foi aplicar microcápsulas de *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus* à produção de salame tipo Italiano, avaliando seus

efeitos sobre as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do salame probiótico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Elaboração das microcápsulas

As culturas liofilizadas de *B. animalis* (BB12) e *L. acidophilus* (LA05) (Christian Hansen) foram ativadas, em caldo MRS e leite em pó integral 10% esterilizado, respectivamente, ambas a 37°C, por 24 horas. Os desenvolvimentos bacterianos foram submetidos à centrifugação a 4670 g, a 4°C por 15 minutos e os precipitados foram lavados em solução salina (0,85%) e centrifugados novamente por duas vezes (LISERRE et al. 2007).

Para a formulação do material de parede foram utilizados os seguintes agentes encapsulantes: acetato ftalato de celulose (5%), glicerol (3,5%), leite em pó integral (3%), maltodextrina (2%), trehalose (2%), frutoligossacarídeo (1%), hi-maize 260 (1%) e Tween 80 (0,1%). Os agentes encapsulantes foram dissolvidos em 100 mL solução tampão fosfato, sob agitação. Ao final da dissolução foi adicionado 1% dos probióticos ativados e centrifugados de *B. animalis*, 13,34 log UFC·g⁻¹, e *L. acidophilus*, 12,89 log UFC·g⁻¹, separadamente, obtendo duas formulações (FÁVARO-TRINDADE & GROSSO, 2000).

Para a microencapsulação foi utilizado um mini *spray dryer* LM, modelo MSD 1.0. As formulações probióticas secas foram coletadas do ciclone, colocadas em frascos de vidro hermeticamente fechados e armazenadas à temperatura ambiente até a utilização.

Elaboração do salame tipo Italiano

Os salames controles (T1) foram elaborados conforme a seguinte formulação: pernil suíno (80%); toucinho (20%); sal (3%); açúcar (0,7%); vinho tinto (0,7%); sal de cura (0,5%); alho em pó (0,5%); pimenta preta moída (0,04%) e cultura *starter* Bactoferm T-SPX - *Staphylococcus xylosus* e *Pediococcus pentosaceus* (0,15%). Para o tratamento 1 (T2) e

tratamento 2 (T3) foram adicionados 1% de microcápsulas de *B. animalis* e *L. acidophilus*, 11,87 log UFC·g⁻¹ e 11,52 log UFC·g⁻¹, respectivamente.

O pernil suíno e o toucinho foram moídos em disco de 10 mm. Em misturadeira foi adicionado, primeiramente, o pernil suíno e parte do sal, para promoção de liga na massa. Posteriormente, foram adicionados o toucinho, o restante do sal e os demais ingredientes; a cultura *starter*, pré-hidratada 30 minutos antes de sua incorporação à massa, em água não clorada, e os probióticos microencapsulados foram os últimos a serem adicionados.

A quantidade de cultura *starter* utilizada baseou-se no número de células viáveis presentes na cultura comercial liofilizada necessárias para atingir, na massa do embutido, valor mínimo de 10⁸ UFC·g⁻¹.

O embutimento foi realizado em tripas de colágeno reconstituído, calibre 45 mm. Posteriormente ao embutimento, as peças de salame foram levadas à câmara de defumação, onde permaneceram por 6 horas. Após a defumação, os salames foram para câmara climatizada com temperatura, velocidade do ar e umidade controladas, conforme TERRA (1998). Ao final do 30º dia, os salames foram acondicionados em embalagem plástica, selados à vácuo e armazenados a temperatura ambiente.

Análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais

As análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas nos dias 1, 7, 14, 21 e 30 de produção e 60, 90 e 120 de armazenamento. As análises físico-químicas realizadas foram: atividade de água (aparelho Testo 400 CE), umidade (AOAC, 2012), perda de peso e pH (TERRA & BRUM, 1988). As análises microbiológicas realizadas foram: enumeração de coliformes à 45°C e *Staphylococcus* coagulase positiva, detecção de *Salmonella* spp. (BRASIL, 2003) e enumeração de *B. animalis* e *L. acidophilus* (LISERRE et al., 2007).

Os salames foram submetidos à análise sensorial de comparação múltipla, avaliando os atributos sensoriais de aparência, aroma, cor, sabor e textura, com escala variando de

extremamente pior que o controle (escore 9) a extremamente melhor que o controle (escore 1), além da intenção de compra, com escala variando de certamente compraria (escore 5) a certamente não compraria (escore 1), segundo DUTCOSKY (2011). As análises foram realizadas no salame pronto para consumo, após 30 dias, e nos salames armazenados por 60, 90 e 120 dias. Foram selecionados 50 provadores não treinados, porém consumidores de salame. Este estudo obteve aprovação junto ao Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria, com protocolo sob o nº 0125.0.243.000-10.

Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, realizado em triplicata, e todos os dados foram avaliados através de Análise de Variância (ANOVA), sendo que as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$), utilizando o software SAS (Statistic Analysis System, versão 9).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises físico-químicas

Considerando os resultados observados na Figura 1, verificou-se que não houve diferenças significativas entre as médias do pH, atividade de água, umidade e perda de peso, entre o controle e os tratamentos, durante os 120 dias de análise. Tal constatação pode ser explicada pelo fato de que os micro-organismos encapsulados estavam aprisionados na microcápsula e, portanto, sem contato com nutrientes para promoverem a fermentação, o que influenciaria diretamente nos valores de pH e conseqüentemente, na atividade de água, umidade e perda de peso (RUIZ, 2011).

A queda do pH para valores próximos a 5,0 nos primeiros dias de fermentação, reflete no efeito protetor contra micro-organismos indesejáveis, conversão e estabilização da cor, formação de compostos desejáveis de sabor e aroma (TYÖPPÖNEN et al., 2003); além de alcançar o ponto isoelétrico das proteínas miofibrilares da carne, provocando perda de água e

obtenção de textura no produto (CAMPOS, 2002). De acordo com TERRA et al. (2004), a partir do sétimo dia de fabricação, os valores de pH sofrem aumento devido às reações de descarboxilação e desaminação de aminoácidos, liberando amônia no meio, alcalinizando-o.

A umidade e a atividade de água são determinações utilizadas para medir o teor de água nos alimentos e estão relacionadas entre si. A atividade de água indica a quantidade de água disponível para as reações bioquímicas, físico-químicas e enzimáticas necessárias para o desenvolvimento de micro-organismos (JAY, 2005). Dessa forma, o teor de água do produto constitui um importante fator para sua conservação, pois a redução no teor de água torna o ambiente desfavorável ao crescimento e à multiplicação de micro-organismos deteriorantes e patogênicos (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Para a atividade de água foram encontrados valores abaixo do valor máximo de 0,90, recomendado pela legislação brasileira para o salame tipo Italiano (BRASIL, 2000). A redução inicial é desejável sendo decorrente do processo de secagem onde a água essencial para a multiplicação de micro-organismos é retirada da massa do salame (TYÖPPÖNEN et al., 2003). Segundo MAURIELLO et al. (2004) quando o pH se aproxima do ponto isoelétrico das proteínas ocorre uma diminuição na capacidade de retenção de água, facilitando à desidratação e conseqüentemente a redução na atividade de água dos salames.

A determinação da perda de peso é uma medida que mostra indiretamente a quantidade de água eliminada pelo embutido durante o período de secagem e depende da temperatura, umidade relativa no interior da câmara de maturação e do tempo de processamento (PELEGRINI et al, 2008). MACEDO et al. (2008) citam que o salame tipo Italiano pode perder até 40% de seu peso durante o processamento.

A diminuição da quantidade de água dos salames é um dos principais fatores responsáveis pela textura do produto final (FRANÇOIS et al., 2009). Durante a maturação também ocorre o desenvolvimento do *flavour* dos salames, por uma série de reações químicas

e bioquímicas envolvendo as proteínas, as gorduras e os carboidratos (SAWITZKI et al., 2008).

Análises microbiológicas

As análises microbiológicas mostraram que não foi detectada em nenhum tratamento durante todo o período de produção dos salames a presença de *Salmonella* spp. e contagens $<1 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ de coliformes a 45°C e *Staphylococcus* coagulase positiva, resultados estes de acordo com Brasil (2001). O processo fermentativo provocado pelas bactérias lácticas, ocorrido durante o período de fabricação, favoreceu a acidificação intensa do meio cárneo e facilitou a eliminação da microbiota contaminante (JAY, 2005). Em decorrência destes resultados, as amostras foram consideradas em condições apropriadas para o consumo do ponto de vista sanitário.

Conforme resultados observados na Figura 2, houve diferença significativa tanto para *B. animalis* quanto para *L. acidophilus*, durante os 120 dias de análises, verificando um decréscimo nas contagens com o passar dos dias. Isso pode ser explicado, pois os microorganismos são metabolicamente ativos dentro das microcápsulas, produzindo ácidos metabólicos e bacteriocinas e/ou a perda de substratos (PEDROSO et al., 2012). Ao final de 90 dias, as contagens foram superiores a $6 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$, sendo este o mínimo aceitável para o efeito probiótico em produtos (ROY, 2005). Porém, atualmente, a recomendação é estabelecida com base na porção diária de alimento, pela legislação brasileira, que o mínimo estipulado seja de $8 \log \text{UFC} \cdot \text{g} \cdot \text{dia}^{-1}$ (BRASIL, 2008).

Análise sensorial

De acordo com os resultados visualizados, na Tabela 1, não houve diferenças significativas entre os tratamentos e o controle quanto aos atributos sensoriais de aparência, aroma, cor, sabor e textura, verificando que as microcápsulas não alteraram sensorialmente o

salame. Quanto à intenção de compra, os índices de aceitação foram superiores a 95%, demonstrando a viabilidade comercial dos salames.

CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a aplicação de microcápsulas de *B. animalis* e *L. acidophilus* à produção de salame tipo Italiano, não alterou suas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais, e que ao final de 90 dias as contagens de *B. animalis* e *L. acidophilus* foram superiores a 6 log UFC·g⁻¹, demonstrando o potencial probiótico do salame.

REFERÊNCIAS

- AMMOR, M.; MAYO, B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. An update. **Meat Science**, v.76, n.1, p.138-146, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174006003627>>. Acesso em: 10 abr. 2014. doi: 10.1016/j.meatsci.2006.10.022.
- AZEREDO, H.M.C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.16, n.1, p.89-97, 2005. Disponível em: <<http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/view/106/119>>. Acesso em: 09 abr. 2014. doi: ISSN 0103-4235.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 22, de 31 de julho de 2000. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Copa, de *Jerked Beef*, de Presunto tipo Parma, de Presunto Cru, de Salame, de Salaminho, de Salame tipo Alemão, de Salame tipo Calabrês, de Salame tipo Friolano, de Salame tipo Napolitano, de Salame tipo Hamburguês, de Salame tipo Italiano, de Salame tipo Milano, de Linguiça Colonial e Pepperoni. **Diário Oficial da União**, Brasília, 03 de agosto de 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Aprova os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 de setembro de 2003.

CAMPOS, R.M.L. **Influência da alimentação na qualidade da carcaça suína e do pernil para a fabricação do salame tipo Italiano**. 2002. 186 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.

DUTCOSKY, S.D. **Análise sensorial de alimentos**. 3. ed. Curitiba: Champagnat, 2011. 239 p.

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. The effect of the immobilization of *L. acidophilus* and *B. lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. **Milchwissenschaft**, v.55, n.9, p.496-499, 2000. Disponível em: <<http://www.cabdirect.org/abstracts/20000406005.html>>. Acesso em: 09 abr. 2014. ISSN: 0026-3788.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008. 182 p.

FRANÇOIS, P. et al. Propriedades físico-químicas e sensoriais de embutidos fermentados formulados com diferentes proporções de carne suína e de ovelhas de descarte. **Ciência Rural**, v.39, n.9, p.2584-2589, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782009000900031&lang=pt>. Acesso em: 08 abr. 2014. doi: 10.1590/S0103-84782009000900031.

GHARSALLAOUI, A. et al. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. **Food Research International**, v.40, n.9, p.1107-1121, 2007.

Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996907001238>>.

Acesso em: 01 abr. 2014. doi: 10.1016/j.foodres.2007.07.004.

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

LISERRE, A.M. et al. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, v.21, n.1, p.1-16, 2007. Disponível em:

<<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08905430701191064#.UtZvRvRDvT8>>.

Acesso em: 06 abr. 2014. doi: 10.1080/08905430701191064.

MACEDO, R.E.F. et al. Desenvolvimento de embutido fermentado por *Lactobacillus* probióticos: características de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.3, p.509-519, 2008. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612008000300002&script=sci_arttext>. Acesso em: 08 abr. 2014. doi: 10.1590/S0101-20612008000300002.

MAURIELLO, G. et al. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. **Meat Science**, v.67, n.1, p.149-158, 2004. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174003002699>>. Acesso em: 05 abr.

2014. doi: 10.1016/j.meatsci.2003.10.003.

OLIVEIRA, A.C. et al. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by *spray drying*. **Journal of Microencapsulation**, v.24, n.7, p.685-693, 2007. Disponível em:

<<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/02652040701532908>>. Acesso em: 07 abr.

2014. doi: 10.1080/02652040701532908.

PEDROSO, D.L. et al. Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. **International Dairy Journal**, v.26, n.2, p.127-132, 2012. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694612001021>>. Acesso em: 27 jan. 2014. doi: 10.1016/j.idairyj.2012.04.008.

PELEGRINI, L.F.V. et al. Elaboração de embutido fermentado tipo salame utilizando carne de ovelhas de descarte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.150-153, 2008.

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612008000500023&script=sci_arttext>. Acesso em: 08 abr. 2014. doi: 10.1590/S0101-20612008000500023.

ROY, D. Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. **Lait**, v.85, n.1-2, p.39-56, 2005. Disponível em: <<http://hal.archives-ouvertes.fr/docs/00/89/55/93/PDF/hal-00895593.pdf>>. Acesso em: 07 jan. 2014. doi: 10.1051/lait:2004026.

RUIZ, J.N. **Aplicação de microrganismos probióticos nas formas livre e microencapsulada em salame tipo Italiano**. 2011. 125f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

SAWITZKI, M.C. et al. *Lactobacillus plantarum* AJ2 isolated from naturally fermented sausage and its effects on the technological properties of Milano-type salami. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.3, p.709-717, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612008000300030&lang=pt>. Acesso em: 08 abr. 2014. doi: 10.1590/S0101-20612008000300030.

TERRA, A.B.M.; FRIES, L.L.M.; TERRA, N.N. **Particularidades na fabricação de salame**. São Paulo: Livraria Varela, 2004. 152 p.

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

TERRA, N.N.; BRUM, M.A.R. **Carne e seus derivados**. Técnicas de controle de qualidade. São Paulo: Nobel, 1988. 121 p.

TYÖPPÖNEN, S. et al. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v.83, n.3, p.233-244, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160502003793>>. Acesso em: 07 abr. 2014. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00379-3.

WEICHERT, S. et al. The role of prebiotics and probiotics in prevention and treatment of childhood infectious diseases. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v.31, n.8, p.859-862. 2012. Disponível em: <http://journals.lww.com/pidj/Documents/Prebiotics_and_Probiotics%20ESPID%20Aug%2012.pdf>. Acesso em: 07 abr. 2014. doi: 10.1097/INF.0b013e3182620e52.

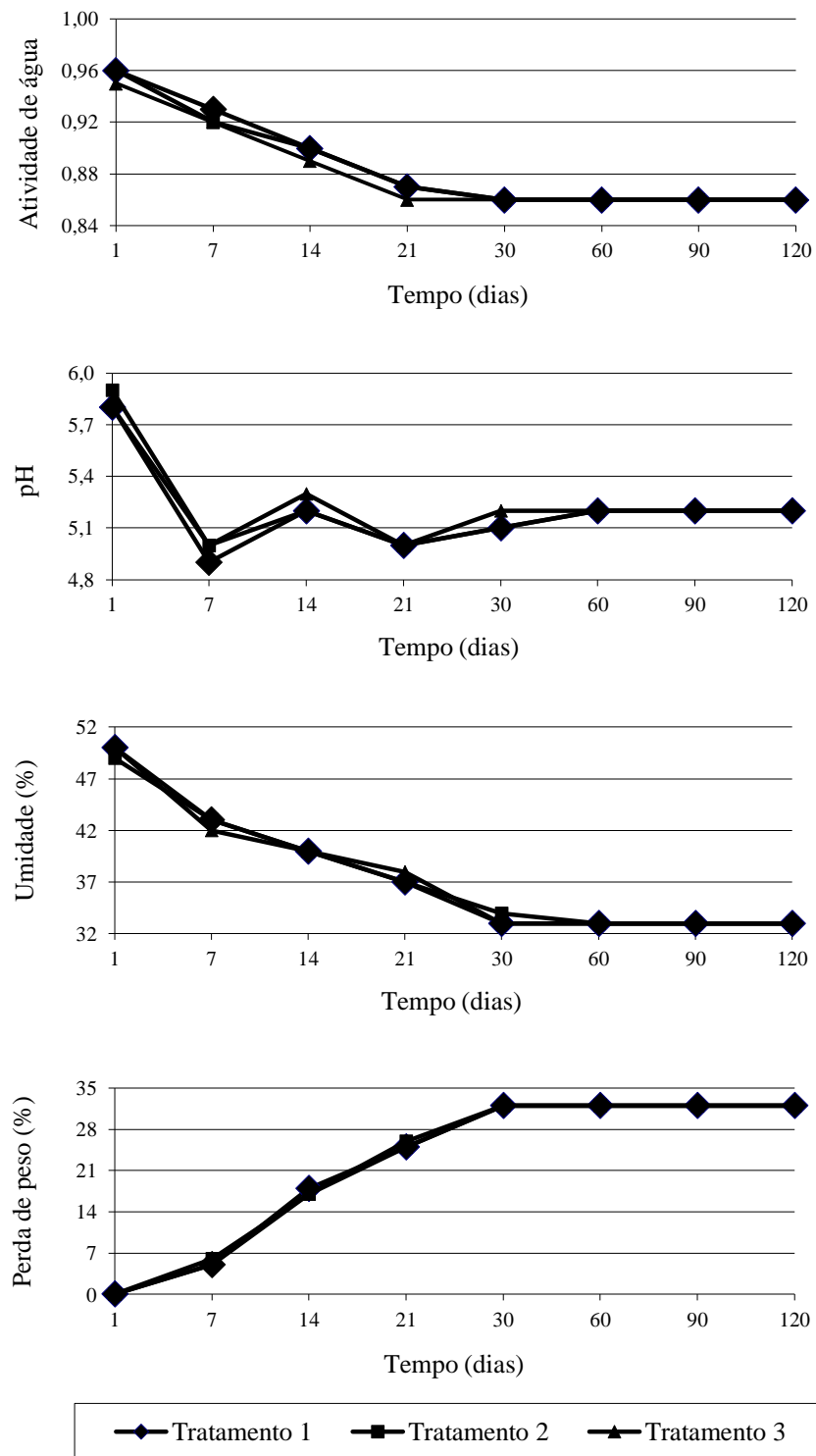


Figura 1 – Valores de atividade de água, pH, umidade e perda de peso dos salames durante os 120 dias de análises. Tratamento 1: controle; Tratamento 2: adição de microcápsulas de *B. animalis* e Tratamento 3: adição de microcápsulas de *L. acidophilus*.

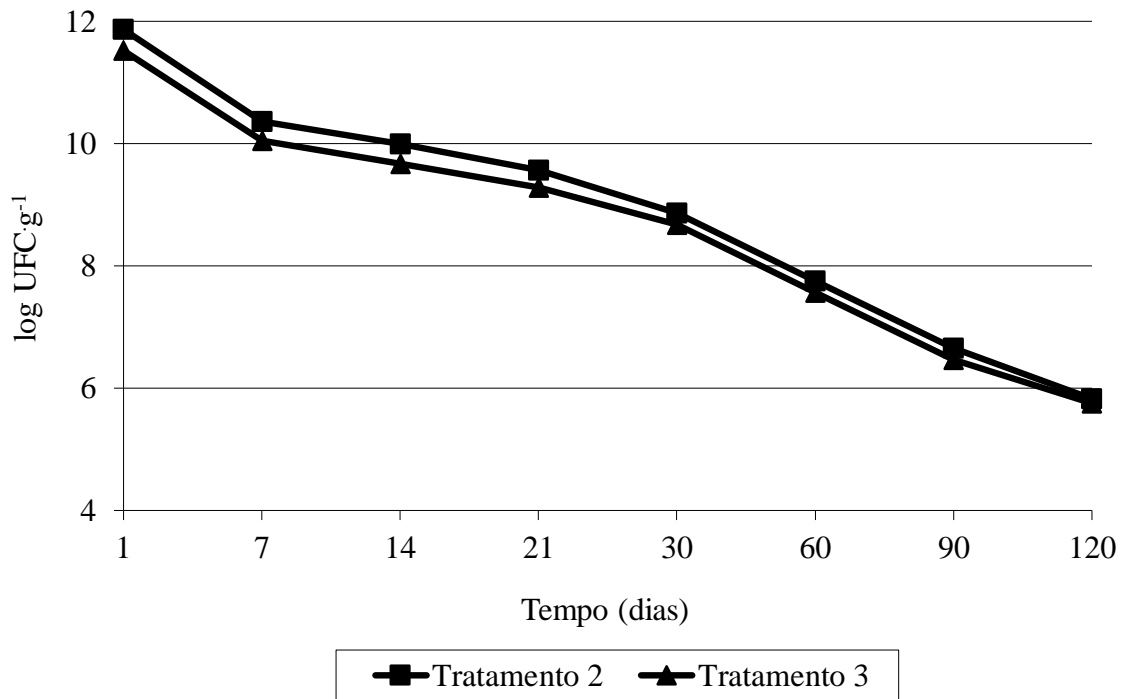


Figura 2 – Contagens de *B. animalis* e *L. acidophilus* nos salames durante os 120 dias de análises. Tratamento 2: adição de microcápsulas de *B. animalis* e Tratamento 3: adição de microcápsulas de *L. acidophilus*.

Tabela 1 – Perfil sensorial e intenção de compra dos salames tipo Italiano adicionados de microcápsulas de *B. animalis* (T2) e *L. acidophilus* (T3) aos 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento.

Atributos sensoriais / Intenção de compra		Tempo (dias)			
		30	60	90	120
Aparência	T2	5,01 ± 0,14 ^{Aa}	4,97 ± 0,03 ^{Aa}	4,97 ± 0,07 ^{Aa}	5,02 ± 0,11 ^{Aa}
	T3	4,99 ± 0,13 ^{Aa}	4,96 ± 0,08 ^{Aa}	5,00 ± 0,05 ^{Aa}	4,99 ± 0,04 ^{Aa}
Aroma	T2	4,98 ± 0,07 ^{Aa}	4,98 ± 0,03 ^{Aa}	5,00 ± 0,06 ^{Aa}	4,99 ± 0,14 ^{Aa}
	T3	5,00 ± 0,12 ^{Aa}	5,00 ± 0,05 ^{Aa}	5,01 ± 0,03 ^{Aa}	4,99 ± 0,06 ^{Aa}
Cor	T2	5,00 ± 0,12 ^{Aa}	5,02 ± 0,10 ^{Aa}	4,98 ± 0,04 ^{Aa}	4,99 ± 0,09 ^{Aa}
	T3	5,01 ± 0,05 ^{Aa}	5,02 ± 0,04 ^{Aa}	4,99 ± 0,12 ^{Aa}	4,98 ± 0,13 ^{Aa}
Sabor	T2	4,98 ± 0,09 ^{Aa}	5,00 ± 0,09 ^{Aa}	4,99 ± 0,13 ^{Aa}	4,98 ± 0,15 ^{Aa}
	T3	4,97 ± 0,08 ^{Aa}	5,00 ± 0,02 ^{Aa}	5,01 ± 0,16 ^{Aa}	5,02 ± 0,09 ^{Aa}
Textura	T2	4,99 ± 0,14 ^{Aa}	4,98 ± 0,08 ^{Aa}	5,00 ± 0,12 ^{Aa}	5,01 ± 0,13 ^{Aa}
	T3	4,98 ± 0,09 ^{Aa}	5,01 ± 0,07 ^{Aa}	4,99 ± 0,04 ^{Aa}	5,01 ± 0,14 ^{Aa}
Intenção de compra	T2	4,84 ± 0,13 ^{Aa}	4,85 ± 0,06 ^{Aa}	4,79 ± 0,04 ^{Aa}	4,80 ± 0,09 ^{Aa}
	T3	4,98 ± 0,07 ^{Aa}	4,87 ± 0,12 ^{Aa}	4,83 ± 0,10 ^{Aa}	4,81 ± 0,14 ^{Aa}

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram microencapsulados *B. animalis* e *L. acidophilus* avaliando a sobrevivência destes sob condições gastrointestinais simuladas e a viabilidade durante 120 dias de armazenamento a 4°C e 25°C, além da análise morfológica das microcápsulas.

Na avaliação da sobrevivência dos probióticos às condições gastrointestinais simuladas, tanto *B. animalis* e *L. acidophilus* livres não resistiram às condições gastrointestinais simuladas, com contagem $<1 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ de ambos após 120 e 240 minutos de incubação, respectivamente. Um dos principais problemas dos probióticos é a baixa taxa de sobrevivência destes em pH gástrico e a altas concentrações de sais biliares no intestino (SABIKHI et al., 2010). O mesmo não foi verificado para *B. animalis* e *L. acidophilus* microencapsulados, onde após 360 minutos de incubação possuíam 9,86 e 9,03 $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$, respectivamente, demonstrando que a microencapsulação protege os micro-organismos das condições gastrointestinais simuladas. A redução da contagem até 30 minutos de incubação e crescimento posterior deve-se a utilização de acetato ftalato de celulose como material de parede, o qual é gastrorresistente, ou seja, somente dissolve-se em pH acima de 6,0, retardando a liberação dos micro-organismos probióticos, para que a mesma não ocorra no estômago e sim no intestino (HEIDEBACH et al., 2012).

Na avaliação da viabilidade dos probióticos microencapsulados durante armazenamento, houve diferença significativa ($p < 0,05$) tanto para *B. animalis* quanto para *L. acidophilus* armazenados a 4°C e 25°C, durante os 120 dias de análises, verificando um decréscimo nas contagens com o passar dos dias. Isso pode ser explicado, pois os micro-organismos são metabolicamente ativos dentro das microcápsulas, produzindo ácidos metabólicos e bacteriocinas e/ou a perda de substratos (PEDROSO et al., 2012). Entretanto, ao final dos 120 dias, as contagens foram superiores a 6 $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$, sendo este o mínimo aceitável para efeito probiótico em produtos alimentícios (ROY, 2005; SABIKHI et al., 2010). Porém, a legislação brasileira (BRASIL, 2008), estabelece o limite mínimo de 8 $\log \text{UFC} \cdot \text{g} \cdot \text{dia}^{-1}$ com base na porção diária de alimento, o que reduziria a viabilidade tanto do *B. animalis* como do *L. acidophilus* para 80 dias à 4°C e 60 dias à 25°C. Também houve diferença significativa ($p < 0,05$) quando da comparação de *B. animalis* e *L. acidophilus* armazenados a 4°C e 25°C. Estes resultados sugerem que a estabilidade dos probióticos microencapsulados aumenta com a diminuição da temperatura. Tal fenômeno ocorre, pois os

micro-organismos são mantidos num estado latente, evitando rearranjos no material de parede, impedindo, dessa forma, a exposição inadequada dos micro-organismos, promovendo um aumento da vida útil das microcápsulas (ALBERTINI et al., 2010). Temperaturas próximas a 0°C melhoram os índices de viabilidade celular, pois reduzem as taxas de reações químicas que são prejudiciais para os micro-organismos, tais como a oxidação (NAG et al., 2011).

Na análise morfológica das microcápsulas, as imagens capturadas através de microscopia eletrônica de varredura, demonstraram a forma esférica das microcápsulas, com superfície contínua relativamente lisa, sem fissuras ou poros pronunciados, o que facilita o escoamento e a dispersão do material (OKURO, et al., 2013).

As microcápsulas produzidas de *B. animalis* e *L. acidophilus* foram aplicadas à produção de salame tipo Italiano, avaliando seus efeitos sobre as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do salame probiótico. Foram produzidos salames sem adição de microcápsulas probióticas (controle – T1) e com adição de microcápsulas de *B. animalis* (T2) e *L. acidophilus* (T3).

Levando em consideração os resultados obtidos, verificou-se que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as médias do pH, atividade de água, umidade e perda de peso, entre o controle (T1) e os tratamentos (T2 e T3), durante os 120 dias de análise. Tal constatação pode ser explicada pelo fato de que os micro-organismos encapsulados estavam aprisionados na microcápsula e, portanto, sem contato com nutrientes para promoverem a fermentação, o que influenciaria diretamente nos valores de pH, e conseqüentemente, na atividade de água, umidade e perda de peso (RUIZ, 2011).

Foi observado durante o período de produção dos salames que em todos os tratamentos, os valores de pH diminuíram até o sétimo dia de elaboração, de aproximadamente 5,8 para 5,0. Essa queda ocorreu provavelmente devido ao acúmulo de ácido láctico, formado pela ação das bactérias ácido lácticas sobre os carboidratos presentes na massa cárnea (TERRA, 1998). O declínio no valor de pH durante os primeiros dias de fermentação é muito importante para a produção de salames de alta qualidade e segurança devido à inibição de micro-organismos indesejáveis (antagonismo competitivo), conversão e estabilização da cor (mioglobina nitrosa) e formação de compostos desejáveis de sabor e aroma (TERRA, 2004).

Durante a fermentação, três grandes grupos de substâncias presentes influenciam os valores de pH: os ácidos orgânicos oriundos da fermentação dos açúcares, os compostos

básicos resultantes da proteólise gerada pelos micro-organismos ou pelas próprias enzimas tissulares e os ácidos orgânicos procedentes da hidrólise das gorduras (MACEDO, 2005).

Após o sétimo dia, foi observado um aumento dos valores de pH em todos os tratamentos, para 5,3, devido ao aumento da atividade proteolítica, com a formação de peptídeos, aminoácidos e compostos nitrogenados não protéicos durante a maturação (GRECO et al., 2005; OLESEN, 2004). Os valores finais de pH variaram entre 5,1 e 5,2 para os salames tipo Italiano do presente estudo, coerentes aos valores encontrados por Ambrosiadis et al. (2004), Cavenaghi, (2005) e Korel e Acton (2002). Valores de pH inferiores a 6,2 tornam os produtos cárneos mais protegidos contra a ação de micro-organismos indesejáveis (DURÁ et al., 2004).

A atividade de água diminuiu em todos os tratamentos durante o processamento, atingindo valores abaixo do nível máximo de 0,90, recomendado pela legislação brasileira para os salames tipo Italiano (BRASIL, 2000). Esta redução pode ser atribuída ao decréscimo nos valores de pH, pois a capacidade de retenção de água das proteínas da carne é diminuída quando o pH se aproxima do seu ponto isoelétrico, acelerando a desidratação e consequentemente reduzindo a atividade de água (MAURIELLO et al., 2004). Työppönen et al. (2003) comentaram que a atividade de água constitui o mais importante fator para a multiplicação microbiana e por isso sua diminuição torna-se o obstáculo de maior efeito sobre a multiplicação de micro-organismos indesejáveis no salame.

A perda de peso foi de aproximadamente 32% tanto para o controle como para os salames adicionados de *B. animalis* e *L. acidophilus*, não sendo observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Esses valores permaneceram dentro da faixa de 30 a 40%, considerada ideal para produtos fermentados secos, uma vez que perdas de peso maiores que esses valores dificultam a viabilidade econômica dos embutidos fermentados (RECH, 2010). A perda de peso está relacionada à acidificação da massa. Por sua vez, esta condição está relacionada ao valor de pH, que quanto menor ocasiona uma maior perda de água durante o processamento, haja vista que o pH é um dos principais fatores que influenciam na difusão da água do interior para a superfície do salame (RUIZ, 2011). Após o período de produção, os salames foram armazenados em embalagem a vácuo, não permitindo trocas gasosas com o exterior e, por esta razão, a perda de peso permaneceu estável. (ANSELMO et al., 2008).

As análises microbiológicas mostraram que não foi detectada em nenhum tratamento durante todo o período de produção dos salames a presença de *Salmonella* spp. e contagens $< 1 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ de coliformes a 45°C e *Staphylococcus* coagulase positiva, resultados estes de

acordo com Brasil (2001). O processo fermentativo provocado pelas bactérias lácticas, ocorrido durante o período de fabricação, favoreceu a acidificação intensa do meio cárneo e facilitou a eliminação da microbiota contaminante (JAY, 2005). Em decorrência destes resultados, as amostras foram consideradas em condições apropriadas para o consumo do ponto de vista sanitário.

Com relação à contagem de *B. animalis* e *L. acidophilus*, houve diferença significativa ($p < 0,05$) para ambos, durante os 120 dias de análises, verificando um decréscimo nas contagens com o passar dos dias. Pedroso (2011) comenta que a perda da viabilidade durante o armazenamento pode estar relacionada a uma série de fatores, incluindo formação de radicais livres na presença de oxigênio, oxidação de ácidos graxos e danos no DNA das células. Ao final de 90 dias, as contagens foram superiores a $6 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$, sendo este o mínimo aceitável para o efeito probiótico em produtos alimentícios (KRASAEKOOPT et al., 2003; LÜCKE, 2000; THARMARAJ e SHAH, 2003). Porém, atualmente, a recomendação é estabelecida com base na porção diária de alimento, pela legislação brasileira, que o mínimo estipulado seja de $8 \log \text{UFC} \cdot \text{g} \cdot \text{dia}^{-1}$ (BRASIL, 2008). O que, reduziria para em torno de 53 dias a viabilidade do salame tipo Italiano com adição de *B. animalis* e para 48 dias com adição de *L. acidophilus*. Uma alternativa para garantir maior viabilidade do que a alcançada neste trabalho seria um maior enriquecimento das microcápsulas com nutrientes ou aumento da resistência das microcápsulas ou aumentando a carga microbiana inicial ou redução do prazo de validade dos salames probióticos.

Durante o período de armazenamento, os salames foram analisados sensorialmente a cada 30 dias. Na análise sensorial por comparação múltipla foi observado que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos, onde os atributos de aparência, aroma, cor, sabor e textura variaram entre nenhuma diferença do controle e ligeiramente melhor que o controle, sugerindo que todos os tratamentos podem ser considerados aceitáveis até os 120 dias de armazenamento em temperatura ambiente, demonstrando que as microcápsulas não alteraram sensorialmente o salame. Quanto à intenção de compra, os valores variaram entre provavelmente compraria e certamente compraria, também não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos, demonstrando a aceitação dos salames pelos provadores e um grande potencial de venda no mercado. Provavelmente a intenção de compra aumentaria ainda mais se os consumidores fossem informados das vantagens e benefícios que os alimentos probióticos trazem à saúde.

4 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a microencapsulação de *B. animalis* ou *L. acidophilus* produziu microcápsulas esféricas, com superfície contínua, relativamente lisa, sem fissuras ou poros pronunciados, que foram eficientes na proteção dos micro-organismos microencapsulados contra as condições gastrointestinais simuladas. Além disso, podem ser armazenadas, com melhores resultados, a 4°C por 120 dias. A aplicação das microcápsulas de *B. animalis* e *L. acidophilus* à produção de salame tipo Italiano, não alterou suas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais, e que ao final de 90 dias, as contagens de *B. animalis* e *L. acidophilus* foram superiores a 6 log UFC·g⁻¹.

Portanto, é possível a produção de salames tipo Italiano com propriedades probióticas. No entanto, sugere-se que salames probióticos devem ser projetados de tal forma que os micro-organismos possam manter sua viabilidade até o final do prazo de validade do produto, seja alterando a estrutura da microcápsula ou aumentando a carga microbiana inicial ou reduzindo a vida de prateleira do produto.

REFÊRENCIAS

ALBERTINI, B. et al. Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, n.4, p.359-366, 2010.

ANSELMO, G.C.S.; MATA, M.E.R.M.; RODRIGUES, E. Comportamento higroscópico do extrato seco de urucum (*Bixa Orellana* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.6, p.1888-1892, 2008.

AMBROSIADIS, J. et al. Physicochemical, microbiological and sensory attributes for the characterization of Greek traditional sausages. **Meat Science**, v.66, n.2, p.279-287, 2004.

AMMOR, M.; MAYO, B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. An update. **Meat Science**, v.76, n.1, p.138-146, 2007.

AZEREDO, H.M.C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.16, n.1, p.89-97, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 22, de 31 de julho de 2000. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Copa, de *Jerked Beef*, de Presunto tipo Parma, de Presunto Cru, de Salame, de Salaminho, de Salame tipo Alemão, de Salame tipo Calabrês, de Salame tipo Friolano, de Salame tipo Napolitano, de Salame tipo Hamburguês, de Salame tipo Italiano, de Salame tipo Milano, de Linguiça Colonial e Pepperoni. **Diário Oficial da União**, Brasília, 03 de agosto de 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, 09 de janeiro de 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em julho, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 29 mai. 2014.

CAVENAGHI, A.D. **Elaboração de embutidos fermentados cozidos com carne de coxa de frango**. 2005. 181f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

COSTA, N.M.B.; ROSA, C.O.B. **Alimentos funcionais. Componentes biotivos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010.

DOLINSKY, M. **Nutrição funcional**. São Paulo: Editora Roca, 2009.

DURÁ, M.A.; FLORES, M.; TOLDRÁ, F. Effect of *Debaryomyces* spp. On the proteolysis of dry-fermented sausages. **Meat Science**, v.68, n.2, p.319-328, 2004.

GHARSALLAOUI, A. et al. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. **Food Research International**, v.40, n.9, p.1107-1121, 2007.

GRECO, M. et al. Evolution and identification of lactic acid bacteria isolated during the ripening of Sardinian sausages. **Meat Science**, v.69, n.4, p.33-739, 2005.

HEIDEBACH, T. et al. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.52, n.4, p.291-311, 2012

KOREL, F.; ACTON, J. Composition of fermented sausages in the USA retail market. **Fleischwirtschaft International**, n.4, p.35-38, 2002.

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

LEROY, F. et al. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, n.3, p.270-285, 2006.

LÜCKE, F.K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, v.56, n.2, p.105-115, 2000.

MACEDO, R.E.F. **Utilização de culturas lácticas probióticas no processamento de produto cárneo fermentado**. 2005. 193f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MACEDO, R.E.F. et al. Desenvolvimento de embutido fermentado por *Lactobacillus* probióticos: características de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.3, p.509-519, 2008.

MAURIELLO, G. et al. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. **Meat Science**, v.67, n.1, p.149-158, 2004.

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

NAG, A. et al. Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodium caseinate and gellan gum. **International Dairy Journal**, v.21, n.4, p.247-253, 2011.

OKURO, P.K. et al. Co-encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. **Food Research International**, v.53, n.1, p.96-103, 2013.

OLESEN, P.T.; MEYER, A.S.; STAHNKE, L.H. Generation of flavour compounds in fermented sausages – the influence of curing ingredients, *Staphylococcus* starter culture and ripening time. **Meat Science**, v.66, n.3, p.675-687, 2004.

OLIVEIRA, A.C. et al. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, v.24, n.7, p.685-693, 2007.

PEDROSO, D.L. **Produção e avaliação de micropartículas lipídicas contendo *Lactobacillus acidophilus* ou *Bifidobacterium lactis* produzidas por spray chilling**. Pirassununga, 2011. 77f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2011.

PEDROSO, D.L. et al. Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. **International Dairy Journal**, v.26, n.2, p.127-132, 2012.

POULIN, J.F. et al. β -lactoglobulin tablets as a suitable vehicle for protection and intestinal delivery of probiotic bacteria. **International Journal of Pharmaceutics**, v.405, n.1-2, p.47-54, 2010.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v.27, n.1, p.1-11, 2010.

ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive Liver Disease**, v.34, n.2, p.105-110, 2002.

ROY, D. Technological aspects related to the use of *bifidobacteria* in dairy products. **Lait**, v.85, n.1-2, p.39-56, 2005.

RUIZ, J.N. **Aplicação de microrganismos probióticos nas formas livre e microencapsulada em salame tipo Italiano**. 2011. 125f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

RECH, G.A. **Produção de salame tipo italiano com teor de sódio reduzido**. 2010. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

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

SUAVE, J. et al. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v.7, n.2, p.12-20, 2006.

TERRA, N.N. **Apontamentos de tecnologia de carnes**. São Leopoldo: UNISINOS, 1998.

TERRA, A.B.M.; FRIES, L.L.M.; TERRA, N.N. **Particularidades na fabricação de salame**. São Paulo: Varela, 2004.

THARMARAJ, N.; SHAH, N.P. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacterium*. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.7, p.2288-2296, 2003.

TYÖPPÖNEN, S. et al. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v.83, n.3, p.233-244, 2003.

UFSM. Universidade Federal de Santa Maria. **Estrutura e apresentação de monografias, dissertações e teses: MDT**. 8 ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2012.

WEICHERT, S. et al. The role of prebiotics and probiotics in prevention and treatment of childhood infectious diseases. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v.31, n.8, p.859-862. 2012.

ANEXOS

ANEXO A – Ficha sensorial utilizada para aplicação do teste de comparação múltipla e intenção de compra dos salames tipo Italiano com probióticos.

TESTE DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA

NOME: _____ DATA: _____

Você está recebendo uma amostra controle (C) e 2 amostras codificadas. Compare cada amostra com o controle e identifique se é melhor, igual ou pior que o controle em relação a aparência, aroma, cor, sabor e textura. Em seguida, assinale, nos quadros, o grau de diferença de acordo com a escala:

- 1 - Extremamente melhor que o controle
- 2 - Muito melhor que o controle
- 3 - Regularmente melhor que o controle
- 4 - Ligeiramente melhor que o controle
- 5 - Nenhuma diferença do controle
- 6 - Ligeiramente pior que o controle
- 7 - Regularmente pior que o controle
- 8 - Muito pior que o controle
- 9 - Extremamente pior que o controle

AMOSTRA: _____	AMOSTRA: _____
Aparência: _____	Aparência: _____
Aroma: _____	Aroma: _____
Cor: _____	Cor: _____
Sabor: _____	Sabor: _____
Textura: _____	Textura: _____

TESTE DE INTENÇÃO DE COMPRA

Indique, utilizando a escala abaixo, qual sua atitude se você encontrasse esta amostra à venda:

- 5 - Certamente compraria
- 4 - Provavelmente compraria
- 3 - Talvez comprasse/talvez não comprasse
- 2 - Provavelmente não compraria
- 1 - Certamente não compraria

AMOSTRA: _____
Valor: _____
AMOSTRA: _____
Valor: _____