

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

Maritiele Naissinger da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE MANTEIGA FUNCIONAL
ADICIONADA DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS**

Santa Maria, RS
2019

Maritiele Naissinger da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE MANTEIGA FUNCIONAL ADICIONADA DE
MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos (PPGCTA), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Neila Silvia Pereira dos Santos Richards

Santa Maria, RS
2019

Silva, Maritiele Naissinger
DESENVOLVIMENTO DE MANTEIGA FUNCIONAL ADICIONADA DE
MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS / Maritiele Naissinger
Silva.- 2019.
195 p.; 30 cm

Orientadora: Neila Silvia Pereira dos Santos Richards
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2019

1. Sal hipossódico; 2. Encapsulação; 3. Perfil
lipídico; 4. Análise sensorial; 5. Probióticos. I.
Richards, Neila Silvia Pereira dos Santos II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

© 2019

Todos os direitos autorais reservados a Maritiele Naissinger da Silva. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante citação da fonte.

Endereço: Rua Antonio Botega, n.270, São José, Santa Maria, RS. CEP: 97095-030

Fone: (0xx) 55 99188-6016; E-mail: maritielens@gmail.com

Maritiele Naissinger da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE MANTEIGA FUNCIONAL ADICIONADA DE
MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos (PPGCTA), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

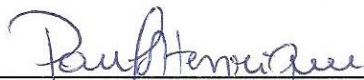
Aprovada em 11 de setembro de 2019:



Neila Silvia Pereira dos Santos Richards, Ph.D. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Pablo Teixeira da Silva, Dr. (UFSM)



Paulo Henrique Fonseca da Silva, Dr. (UFJF)



Gislaine Hermanns, Dr^a. (IFFar)



Vandr e Barbosa Bri o, Dr. (UPF)

Santa Maria, RS
2019

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Marcos e Marli, dedico todo meu crescimento pessoal e profissional. São meus maiores exemplos, e com vocês aprendi o respeito, o amor, a força e a coragem.

À minha irmã Micheline e ao meu noivo Thiago, por serem meus apoios e estarem perto mesmo estando longe.

Gratidão por tê-los.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus pela vida, saúde, por minha família e pela força e coragem de seguir em busca de meus sonhos e objetivos, sempre me iluminando e abençoando meus caminhos.

Aos meus pais Marcos e Marli, pelo apoio, amor e por sempre estarem ao meu lado e não medirem esforços por meus sonhos e felicidade.

À minha irmã Micheline, pela companhia, compreensão, amizade e por torcer incansavelmente por mim.

Ao meu noivo Thiago, pelo amor, companheirismo, amizade, parceria e, principalmente, por ser meu apoio nas horas boas e ruins. Obrigada por vibrar com minhas vitórias, ouvir meus desabafos e nunca me deixar desistir.

À minha amiga Bruna, que iniciou ao meu lado como uma colega e estagiária e hoje se tornou uma grande amiga e parceira de trabalho. Sem tua ajuda, apoio e companhia, esse trabalho teria sido muito mais difícil. Minha eterna gratidão.

À minha avó Tereza, madrinha Tê e sogros Tarso e Carmen Lígia, por todo amor, orações e desejos de sucesso.

Ao meu amigo Marcelo, pela amizade, carinho, parceria e por servir como exemplo de profissional e pessoa.

À minha amiga e colega Franciele, que me acompanha desde o mestrado e com quem divido conquistas e angustias. Obrigada pela amizade sincera e parceria.

À minha amiga e colega Thaianne, por todas as experiências e parcerias divididas dentro dos laboratórios da UFSM, há 6 anos, e na vida, há 22 anos, juntamente com os amigos Nicole, Rudy, Jeferson e Juarez.

Aos amigos e colegas de laboratório, Vinicius, Adrieli, Franciele, Alvaro e Maximiliano, pela amizade, contribuições nas análises laboratoriais, parceria e por tornarem os dias de trabalho mais leves e alegres.

À minha amiga e comadre Monica, pela amizade e palavras de apoio e conforto.

À Fermentech e Coana, pela doação dos microrganismos para condução dos experimentos.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição da UFSM, pela compreensão, coleguismo e apoio.

À minha orientadora Neila, agradeço pela oportunidade concedida na pós-graduação.

Ao Laboratório 3319 e ao grupo de pesquisa em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, local onde passei o meu maior tempo nos últimos cinco anos e vivi momentos únicos. Realizei o sonho da pós-graduação, troquei conhecimentos e experiências, aprendi, errei, chorei, comemorei, firmei parcerias e amizades. Nossos trabalhos de finais de semanas e madrugadas e nossas comemorações estarão sempre nas minhas lembranças. Meu carinho, minha gratidão e eterna saudade.

À Agência de Inovação e Transferência de Tecnologia (AGITTEC) da UFSM, pelo atendimento excepcional e incentivar o pesquisador e o desenvolvimento de trabalhos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos e ao Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da UFSM, bem como os professores, funcionários e colegas, pelos conhecimentos adquiridos, amizades e parcerias durante o trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Santa Maria, que tenho imenso amor e admiração, fica minha eterna gratidão por fazer parte de sua história e ter habitado essa casa que produz conhecimento e amor pelo que fazemos. A UFSM ficará gravada entre minhas melhores memórias.

A todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, meu muito obrigada.

Só se vê bem com o coração, o essencial é invisível aos olhos.

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO DE MANTEIGA FUNCIONAL ADICIONADA DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

AUTORA: Maritiele Naissinger da Silva
ORIENTADORA: Neila S. P. S. Richards

Os produtos lácteos estão entre os alimentos mais consumidos mundialmente, e são estudados quanto aos seus benefícios para a saúde humana. A manteiga é o derivado lácteo que mais causa polêmica quanto ao seu consumo, entretanto, estudos vêm apresentando os benefícios do consumo deste produto. A manteiga é uma matriz láctea pouco explorada para a adição de ingredientes funcionais em sua composição. Buscando o desenvolvimento de uma manteiga probiótica com adição de sal hipossódico, o objetivo deste estudo foi encapsular bactérias probióticas e avaliar a viabilidade probiótica, além de caracterizar o produto e as cápsulas por meio de análises físico-químicas, tecnológicas, sensoriais e testes *in vitro*. A encapsulação foi realizada através da técnica de extrusão, com solução de alginato de sódio 1% m/v e solução de cloreto de cálcio 0,1 mol L⁻¹. A manteiga foi produzida a partir da gordura do leite de vacas da raça Jersey. Foram desenvolvidos seis tratamentos de manteiga, com diferentes teores de cápsulas probióticas e sal hipossódico. As amostras foram submetidas às análises físico-químicas para determinação do teor de gordura, umidade, sólidos desengordurados (ESD), proteína, cloretos, cinzas, índice de peróxidos, acidez total titulável, atividade de água, cor e perfil dos ácidos graxos, além de serem analisadas quanto à textura e à calorimetria. Para comprovar a qualidade higiênica-sanitária e determinar a vida de prateleira, foram realizadas análises microbiológicas para *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, coliformes termotolerantes, *Salmonella* sp. e bolores e leveduras. Todas as análises foram realizadas a cada 15 dias de armazenamento nas amostras mantidas a 5 °C, totalizando 60 dias. A viabilidade do probiótico foi realizada durante o período de armazenamento, também a cada 15 dias, por meio de contagem bacteriana em ágar MRS. Os testes *in vitro* e vida de prateleira mostraram que os tratamentos com adição de 5% e 10% de cápsulas apresentaram maior viabilidade probiótica. A vida de prateleira das cápsulas e das manteigas probióticas encerrou-se com 45 dias de armazenamento, pois no 60º dia apresentaram contagem bacteriana insatisfatória para probiótico e crescimento de bolores.

Palavras-chave: Sal hipossódico; Encapsulação; Perfil lipídico; Análise sensorial.

ABSTRACT

Postgraduate Program in Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria

DEVELOPMENT OF FUNCTIONAL BUTTER WITH THE ADDITION OF PROBIOTIC MICROORGANISMS

AUTHOR: Maritiele Naissinger da Silva

ADVISOR: Neila S. P. S. Richards

Dairy products are among the most consumed foods in the world and are studied for their benefits to human health. Butter is the dairy product that causes the most controversy regarding its consumption, however, studies have shown the benefits of consuming this product. Butter is a little-explored dairy matrix for the addition of functional ingredients in its composition. Seeking the development of a probiotic butter with the addition of hyposodium salt, the aim of this study was to encapsulate probiotic bacteria and evaluate the probiotic viability, besides characterizing the product and capsules through physicochemical, technological, and sensory and in vitro tests. Encapsulation was performed by the extrusion technique with a 1% w/v sodium alginate solution and 0.1 mol L⁻¹ calcium chloride solution. Butter was produced from the milk fat of Jersey cows. Six butter treatments were developed, with different contents of probiotic capsules and hyposodium salt. The samples were submitted to physicochemical analysis to determine the fat content, moisture, degreased solids (DS), protein, chlorides, ashes, peroxide index, total titratable acidity, water activity, color, and fatty acid profile, and finally, the texture and calorimetry. To prove the hygienic-sanitary quality and to determine shelf life, microbiological analyzes were performed for coagulase-positive *Staphylococcus aureus*, thermotolerant coliforms, *Salmonella* sp. and mold and yeast. All analyses were performed every 15 days of storage on samples kept at 5 °C, totaling 60 days. The viability of the probiotic was performed during the storage period, also every 15 days, using bacterial counting on MRS agar. In vitro tests and shelf life showed that the treatments with the addition of 5% and 10% of capsules showed higher probiotic viability. The shelf life of the probiotic capsules and butter ended with 45 days of storage, as on the 60th day they presented unsatisfactory bacterial count for probiotic and mold growth.

Keywords: Hyposodium salt; Encapsulation; Lipid profile; Sensory analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

DESENVOLVIMENTO

- Figura 1 – Esquema da produção de cápsulas probióticas pelo método de encapsulação por extrusão.....40
- Figura 2 – Cápsulas com microrganismos encapsulados formadas pelo processo de extrusão. Imagem capturada por câmera fotográfica digital (Lumix Panasonic) com aumento de 5x.41
- Figura 3 – Estrutura química do alginato com grupos de ácido L - gulurônico (G) e grupos de ácido D - manurônico (M).42
- Figura 4 – Estrutura tridimensional do hidrogel de alginato, com interações entre íons Ca^{2+} e os grupos carboxílicos do alginato.42

MANUSCRITO 2

- Figura 1 – Esquema da produção de cápsulas probióticas pelo método de encapsulação por extrusão.101
- Figura 2 – Resultado do teste de viabilidade probióticas dos microrganismos livres e encapsulados durante análise de comportamento térmico. Resultados expressos em $\log UFC g^{-1}$102
- Figura 3 – Microfotografias óptica das cápsulas de alginato de sódio contendo *Lactobacillus acidophilus*, partidas ao meio, em aumento de 5 x (A) 20 x (B) e 40 x (C).103
- Figura 4 – Microfotografias óptica das cápsulas de alginato de sódio contendo *Lactobacillus acidophilus*, em aumento de 100 x.103
- Figura 5- Morfologia das cápsulas probióticas secas, as cápsulas íntegras em aumento de 40 x (A) e a parede das cápsulas (B), em aumento de 3500 x.104
- Figura 6 - Morfologia das cápsulas probióticas secas, em aumento de 20000 x (A) e 10000 x (B), que indicam a presença do *L. acidophilus*.104

MANUSCRITO 3

- Figura 2 – Resultado do teste de viabilidade probióticas das manteigas durante análise de comportamento térmico. Resultados expressos em $\log UFC.g^{-1}$119
- Figura 3 - Transições polimórficas por meio de curvas de fusão em DSC da manteiga com e sem adição de cápsulas probióticas.130

LISTA DE TABELAS

DESENVOLVIMENTO

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos exigidos pela Portaria nº 146 de 1996.....	35
--	----

MANUSCRITO 1

Table 1 – Average results of the physical-chemical analysis of the samples of national-made butter and imported trademarks, salted.	59
Table 2 – Average results of the physical-chemical analysis of the butter samples of national and imported trademarks, unsalted.	60
Table 3 – Profile of fatty acids (g.100 g ⁻¹) in samples of national and imported salted butters.....	61
Table 4 – Profile of fatty acids (g.100 g ⁻¹) in samples of national and imported salted butters.....	62
Table 5 – Profile of fatty acids (g.100 g ⁻¹) in samples of national and imported unsalted butters.	63
Table 6 – Profile of fatty acids (g.100 g ⁻¹) in samples of national and imported unsalted butters.....	64

NOTA TÉCNICA 1

Tabela 1 – Resultado da manteiga adicionada de probiótico: livre e encapsulado (com adição de 3%, 5% e 10% de cápsulas) durante período de 45 dias de armazenamento sob temperatura de 5 °C. Resultados expressos em log UFC g ⁻¹	76
Tabela 2 – Informações de gênero e faixa etária dos 180 provadores da análise sensorial das duas amostras de manteiga (manteiga padrão e manteiga com 10% de cápsulas). Resultados expressos em frequência (%).	77
Tabela 3 – Resultado da análise sensorial quanto ao teste de aceitação das duas amostras de manteigas (manteiga padrão e manteiga com 10% de cápsulas). Resultados expressos são a média encontrada entre os 180 provadores para cada atributo.....	77
Tabela 4 – Resultado da análise sensorial quanto ao teste de intenção de compra das duas amostras de manteigas (manteiga padrão e manteiga com 10% de cápsulas). Resultados expressos em frequência (%).	78

MANUSCRITO 2

Tabela 1 – Eficiência de encapsulação (EE) das cápsulas probióticas.	99
Tabela 2 - Resultado dos testes de viabilidade dos microrganismos probióticos encapsulados (1%) durante o período de 60 dias de armazenamento sob refrigeração (5 °C). Resultados expressos em log UFC g ⁻¹ . O teste de vida de prateleira foi realizado apenas para as amostras que apresentaram contagem superior a 6 log UFC g ⁻¹ no tempo zero.	99
Tabela 3 – Resultado do teste in vitro da sobrevivência dos probióticos às condições gastrointestinais simuladas. Resultados expressos em log UFC g ⁻¹	100
Tabela 4 – Resultado das análises físico-químicas da cápsula contendo bactérias probióticas.....	100
Tabela 5 – Médias dos tamanhos das partículas probióticas úmidas.	100

MANUSCRITO 3

Tabela 1 – Variáveis e níveis do delineamento experimental para as manteigas probióticas.....	108
Tabela 2 – Resultado da viabilidade do <i>L. acidophilus</i> encapsulado (1%) e da manteiga adicionada das cápsulas. Resultados expressos em log UFC g ⁻¹	115
Tabela 3 – Resultados das análises microbiológicas durante o tempo de armazenamento das amostras de manteigas e cápsula com <i>L. acidophilus</i> . Resultados expressos em UFC/g.	116
Tabela 4 – Resultado do teste in vitro da sobrevivência dos probióticos às condições gastrointestinais simuladas. Resultados expressos em log UFC g ⁻¹	117
Tabela 5 – Resultado dos teores de proteína, cinzas, cloretos e atividade de água no tempo zero (fabricação) e ao final da vida de prateleira das formulações de manteiga.....	121
Tabela 6 – Resultado para o teor de gordura, umidade, índice de peróxidos, acidez na gordura e extrado seco desengordurado (ESD) no tempo zero (fabricação) e ao final da vida de prateleira.	123
Tabela 7 – Resultado das análises de cor dos tratamentos do tempo inicial (0 dias) e final (60 dias) de armazenamento.	125
Tabela 8 – Perfil de ácidos graxos (g.100 g ⁻¹) das amostras de manteigas probióticas.....	126
Tabela 9 - Firmeza, energia de penetração e resistência a sonda em diferentes tratamentos de manteiga.	128
Tabela 10 – Informações de gênero e faixa etária dos 100 provadores da análise sensorial da manteiga probiótica com sal hipossódico. Resultados apresentados em número.....	131
Tabela 11 – Resultado da análise sensorial por meio de teste de aceitação e intenção de compra das amostras de manteigas probióticas. Resultados expressos em número de provadores (n = 100).	132

MANUSCRITO 4

Tabela 1 – Probióticos comerciais utilizados para a avaliação da viabilidade durante a simulação gastrointestinal.	165
Tabela 2 – Viabilidade probiótica dos microrganismos comerciais antes e após a simulação gastrointestinal. Análise realizada em 1g de amostra. Resultados expresso em log UFC g ⁻¹	167

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL.....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 DESENVOLVIMENTO.....	31
3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
3.1.1 Manteiga.....	33
3.1.2 Probióticos.....	35
3.1.3 Alimentos Probióticos	38
3.1.4 Encapsulação de Probióticos	39
3.1.5 Sal Hipossódico	43
3.2 MANUSCRITO 1.....	45
3.3 NOTA TÉCNICA 1.....	65
3.4 MANUSCRITO 2.....	79
3.5 MANUSCRITO 3.....	105
3.6 MANUSCRITO 4.....	143
3.7 DOCUMENTO DO PEDIDO DE PATENTE	169
4 DISCUSSÃO	171
5 CONCLUSÃO.....	177
REFERÊNCIAS	179

APRESENTAÇÃO

A presente tese segue as normas estabelecidas no Manual de Dissertações e Teses: Estrutura e Apresentação – MDT da UFSM (UFSM, 2015). As seções Materiais e Métodos e Resultados e Discussões estão apresentados na forma de uma nota técnica e quatro manuscritos, constando no item 3 Desenvolvimento. Ao final da tese, encontram-se os itens Discussão e Conclusão, que apresentam uma compilação de interpretações e comentários a respeito dos resultados encontrados e que estão contidos nos manuscritos. As Referências encontradas no último item desse documento, referem-se somente às citações que aparecem nos itens Introdução, Revisão Bibliográfica e Discussão.

1 INTRODUÇÃO

O consumo de leite e seus derivados estão entre os alimentos de maior importância. A gordura do leite é, provavelmente, a mais complexa de todas as gorduras comuns, devido sua natureza física e características químicas, e possui na sua composição ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados (MORTENSEN, 2016; KONTKANEN et al., 2011). A manteiga é o produto mais apreciado obtido da gordura do leite, devido aos seus atributos sensoriais e seu valor nutricional, além da existência de componentes saudáveis em sua composição (MÉNDEZ-CID et al., 2017).

A manteiga é um dos ingredientes mais notáveis do mundo pela versatilidade que tem na cozinha, e por estar no dia a dia das pessoas desde o momento do café da manhã. A manteiga oferece ao indivíduo macro e micronutrientes essenciais ao organismo, e é considerada uma excelente fonte de vitamina A e vitaminas do complexo B, como a tiamina (B1), a riboflavina (B2) e a cobalamina (B12). A vitamina D e o ácido fólico também estão presentes, porém, em menores quantidades (MORTENSEN; DENMARK, 2011).

Segundo Barros (2008), manteigas e margarinas estão presentes no dia-a-dia de mais de 50% da população brasileira adulta e idosa. Existem referências do uso da manteiga com fins medicinais, cosméticos e como alimento humano. Seu uso teve início, provavelmente, na Noruega, durante o século VII, de onde passou para outras regiões do norte da Europa (MORTENSEN; DENMARK, 2011; BULDO; WIKING, 2016).

O sistema alimentar está passando por profundo processo de transformação, tanto na base tecnológica como nos padrões de consumo. A inovação e a capacitação científica e tecnológica da indústria de alimentos têm se tornado os temas centrais de debate nos órgãos públicos e nas revistas especializadas. Consumidores desejam alimentos que aliem benefícios à saúde com manutenção da qualidade sensorial. Neste contexto, o sabor controla em grande parte a seleção da dieta. Portanto, a indústria de lácteos no Brasil necessita adequar alguns produtos, especialmente a manteiga, a esta nova demanda do mercado (RICHARDS, 2015).

Diversos são os produtos lácteos em destaque na área de alimentos com alegação funcional, principalmente no âmbito de alimentos probióticos (HILL et al., 2014; CORONA-HERNANDEZ et al., 2013). Os consumidores estão preocupando-se com atributos que vão além da presença de nutrientes e segurança dos mesmos, mas que apresentem também benefícios à saúde. A população vem preferindo alimentos convenientes, autênticos e saudáveis, sem abrir mão da satisfação ao alimentar-se e da segurança do alimento (REIS et al., 2011).

A gordura do leite na percepção de muitos consumidores é um componente negativo em função de sua elevada densidade energética, e por ser fonte de colesterol e ácidos graxos saturados, substâncias estigmatizadas como não saudáveis (KRATZ; BAARS; GUYENET, 2013). Porém, grande parte das características físicas e organolépticas do leite de ruminantes deve-se a sua fração lipídica, além de sua importância tecnológica na fabricação de muitos derivados lácteos (STANTON; McMAHON; MILLS, 2013). O colesterol é uma substância produzida pelo próprio organismo, principalmente no fígado, e está presente em várias partes do corpo, sendo abundante no líquido biliar. O corpo humano precisa dele para desempenhar uma série de funções como, por exemplo, faz parte da constituição da membrana que reveste as células dos tecidos e constitui matéria-prima para a fabricação de ácidos biliares, hormônios e vitamina D (INMETRO, 2016).

Por muito tempo, os alimentos de origem animal, como a manteiga e a banha, foram considerados vilões na saúde humana, vistos como precursores de doenças cardiovasculares, pelos seus teores de ácidos graxos saturados e colesterol. Entretanto, com o avanço das pesquisas, estes produtos de origem animal, vêm sendo excluídos da lista de produtos que trazem prejuízos à saúde, uma vez que mudanças na dieta dos animais alteram o perfil de ácidos graxos que compõem esses alimentos, tornando-os mais adequados nutricionalmente (SCHMIDT, 2016).

Estudos têm apresentado componentes saudáveis da gordura do leite, incluindo o ácido linoléico conjugado (CLA) (MORTENSEN, 2009; HUPPERTZ et al., 2009; MORTENSEN, 2011). O CLA é encontrado principalmente em gorduras e carnes de animais ruminantes, sendo os produtos lácteos, uma das principais fontes alimentares. A manteiga contém cerca de 4,7 mg de CLA/g de gordura e sua composição apresenta em média 15,9% de umidade, 0,9% de proteína, 81,1% de gordura total e 0,1% de lactose (FAO, 2013).

Os isômeros de CLA têm diferentes efeitos fisiológicos, tais como a redução na acumulação de gordura corporal, efeitos antidiabéticos, redução do desenvolvimento de aterosclerose, mineralização óssea aumentada, efeitos anticarcinogênicos, depressor de colesterol, antioxidantes e modulação do sistema imunológico (GURSOY et al., 2003; MORTENSEN; DENMARK, 2011).

Conforme o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), aprovado pelo Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017 e a Portaria nº 146, de 07 de março de 1996, que apresenta o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Manteiga, define-se a manteiga como o produto lácteo gorduroso obtido exclusivamente pela bateção e malaxagem, com ou sem modificação biológica do creme de

leite, por meio de processo específico. A matéria gorda da manteiga deve ser composta exclusivamente de gordura láctea (BRASIL, 2017; BRASIL, 1996). A Portaria 146/1996, ainda determina que a nata para fabricação de manteiga deve ser pasteurizada e derivada exclusivamente do leite de vaca (BRASIL, 1996). Para fins de regulamentação, a Resolução nº 04, de 28 de junho de 2000, institui o produto “manteiga comum”, autorizando a utilização do creme ou gordura láctea proveniente do desnate do leite ácido ou do soro obtido da fabricação de queijos (BRASIL, 2000).

A literatura é escassa ao tratar sobre manteiga com adição de microrganismos probióticos. Entretanto, estudos realizados com adição de *Lactobacillus maltaromicus* e *Lactobacillus casei* em manteigas, provocou uma redução no teor de colesterol do produto (ALO GLU; ONER, 2006), e a adição de *Lactobacillus acidophilus* em manteiga contribuiu para o aumento de ácido linoleico conjugado (CLA) durante o período de armazenamento do produto (ERKAYA et al., 2015).

Os probióticos são considerados promotores da saúde, apresentam grande interesse comercial e mercado em crescimento (YING; SUN; SANGUANSRI; WEERAKKODY; AUGUSTIN, 2012). Em geral, seus benefícios à saúde são baseados na presença de determinadas culturas viáveis de bactérias lácticas que, quando ingeridas em quantidades adequadas, oferecem benefício à saúde. Os principais probióticos são pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que fazem parte da microbiota do intestino humano, pois exercem efeitos benéficos para a saúde humana e melhoram as propriedades da microbiota nativa do organismo (MENEZES; DURRANT, 2008; COOK; TZORTZIS; CHARALAMPOPOULOS, 2012).

Em diversos trabalhos já foram relatadas a eficácia da adição de culturas probióticas em produtos lácteos (ALVES et al., 2009; ALVES et al., 2011; ALVES et al., 2013; RICHARDS et al., 2013; FRIGHETTO et al., 2011). Embora o fator econômico seja importante na aquisição de produtos lácteos, como a manteiga, os consumidores estão se tornando cada vez mais exigentes em relação à qualidade dos alimentos. Assim, a preocupação da indústria não é apenas com o rendimento da manteiga, que pode ser afetado por diversos fatores e com os padrões ditados pela legislação vigente, mas também com a qualidade de seus atributos sensoriais.

A definição mais aceita para probióticos é proposta pela Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO, 2001), que define como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. De acordo com a legislação brasileira, probióticos são definidos como microrganismos vivos

capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2003c).

As exigências que um microrganismo probiótico deve atender são: resistência ao ambiente ácido estomacal, à bile e às enzimas pancreáticas; adesão às células da mucosa intestinal; capacidade de colonização; produção de substâncias antimicrobianas contra as bactérias patogênicas e ausência de translocação (CLAES; VARGAS GARCÍA; LEBEER, 2015).

Na produção de um alimento probiótico é fundamental que o microrganismo possa ser cultivado em escala industrial, sendo que o produto final deve ter vida média satisfatória, propriedades sensoriais aceitáveis e um número de células viáveis presentes no produto maior do que $6 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ ou g^{-1} durante toda a sua validade, segundo Nulkaekul et al. (2012) e o mínimo de $7 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ ou g^{-1} conforme Ying, Sun, Sanguansri, Weerakkody e Augustin (2012). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2008) a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^6 a 10^7 UFC na recomendação diária (porção) do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia por meio de análises como testes *in vitro* ou *in vivo* (NULKAEKUL et al., 2012).

Por isso, o maior desafio na incorporação de probióticos em alimentos está em manter a viabilidade das bactérias durante o processamento e período de armazenamento até o consumo do produto (GRANATO et al., 2010). Nesta conjuntura, a encapsulação surge como uma tecnologia promissora e que já vem sendo utilizada para oferecer proteção aos microrganismos probióticos e aumentar a sua sobrevivência em vários tipos de alimentos (HOMAYOUNI et al., 2008; OZER et al., 2009; HEIDEBACH; FORST; KULOZIK, 2012; MARTÍN et al., 2015).

Encapsulação pode ser definida como uma tecnologia de empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas que são capazes de liberar seu conteúdo em determinado momento sob influência de condições específicas (ZUIDAM; SHIMONI, 2010; MARTÍN et al., 2015). A técnica de encapsulação já é amplamente utilizada nas áreas alimentícia, têxtil, agroquímica e farmacêutica (CAVALHEIRO et al., 2015).

Outro constituinte dos alimentos bastante discutido é o sal, visto que seu consumo, na maioria dos países, tem sido excessivo, variando de 9 a 12 g por pessoa por dia, sendo uma das principais causas do aumento de hipertensão entre jovens, adultos e idosos (NILSON; JAIME; RESENDE, 2012). Em contraste, a Organização Mundial da Saúde recomenda uma ingestão diária, para adultos, de no máximo 5 g de sal (equivalentes a 2.000 mg de sódio).

Estabeleceu-se, em 2007, um termo de cooperação entre o Ministério da Saúde e a principal associação representativa do setor produtivo de alimentos no Brasil, a Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação (ABIA). O objetivo principal está na elaboração de propostas para a reformulação dos alimentos processados, com redução e substituição do sal comum por sal reduzido em sódio ou uso de temperos naturais, sendo que desde 2010 a redução dos teores de sódio é exigida em inúmeros alimentos (ABIA, 2010). O Ministério da Saúde e a ABIA anunciaram que até 2017 conseguiram diminuir mais de 17 mil toneladas de sal de alimentos, sendo que a previsão é que até 2020 sejam retiradas 28,5 mil toneladas de sal de diversos alimentos industrializados (ABIA, 2017). Entre os alimentos que tiveram maior redução estão as margarinas, caldos, temperos prontos, cereais, pães, produtos e embutidos cárneos e requeijão (SOUZA; SOUZA; BEZERRA; SICHIERI, 2016). Entretanto, até o momento não foram apresentados dados de redução de sódio em manteigas.

O cloreto de sódio tem como principal função a conservação e o sabor do alimento, sendo o cloreto um macromineral envolvido no processo digestivo, necessário para a produção de suco gástrico e enzimas; por outro lado, o sódio regula o equilíbrio hídrico do organismo, juntamente com o potássio, e influencia na condução dos impulsos nervosos, contrações musculares e pressão arterial (ÁVILA, 2016).

Estudos mostram resultados positivos para adição de ervas e/ou especiarias em manteigas, sendo estas bem aceitas, além de serem consideradas antioxidantes naturais, apresentam alegações funcionais em organismos humanos (RICHARDS; GIOIELLI, 2016; WILBEY, 2009) e para adição de bactérias probióticas (ERKAYA et al., 2015). O consumo elevado de sal, e conseqüentemente de sódio, propicia o desenvolvimento e a elevação da pressão arterial na população mundial, causando hipertensão, considerado um problema de saúde pública por sua magnitude, risco e dificuldades no seu controle (HE; MACGREGOR, 2010).

Sal hipossódico é o produto elaborado a partir da mistura de cloreto de sódio com outros sais, e de acordo com a legislação brasileira, a Portaria nº 54, de 4 julho de 1995, que aprova o Padrão de Identidade e Qualidade para Sal Hipossódico, é um sal com reduzido teor de sódio que fornece no máximo 50 % do teor de sódio, de modo que a mistura final mantenha poder salgante semelhante ao do sal de mesa comum (BRASIL, 1995).

No Brasil, a média de consumo diário de manteiga é de 20 g, o que representa, em valores, o dobro do recomendado pela Resolução nº 359, de 23 de dezembro de 2003, que estabelece as porções dos alimentos, que recomenda 10 g de manteiga/dia (BRASIL, 2003a). Quando consumida em quantidades moderadas não aumenta o risco de doenças

cardiovasculares e excesso de colesterol (SILVA, 2010). Estudo realizado por Miguel (2009) mostrou que a ingestão de manteiga nas quantidades avaliadas (14 g/dia), não alterou as concentrações de LDL, não havendo mudança no perfil lipídico dos indivíduos que consumiram manteiga. A Resolução nº 360, de 23 de dezembro de 2003, traz que o valor diário de referência para o consumo de gordura saturada é 22 g/dia (BRASIL, 2003b).

Pimpin et al. (2016) analisaram a associação entre o consumo de manteiga com doenças crônicas a nível mundial. A manteiga foi citada como um alimento que deve ser consumido com moderação. Porém, é mais saudável do que alguns açúcares e amidos, além de que os riscos de doenças cardiovasculares e diabetes aumentam dependendo do alimento que estará atrelado ao consumo de manteiga. A pesquisa incluiu 636 mil pessoas que consumiam manteiga diariamente e constatou que o consumo de 14 g/dia não se associa com o diagnóstico de doenças cardíacas.

Entretanto, a adição de componentes funcionais em manteigas é pouco explorada. O desenvolvimento de manteiga com adição de bactérias probióticas encapsuladas e com redução do teor de sódio, torna-se uma alternativa inovadora e atrativa às indústrias e aos consumidores. Sendo assim, por ser incipiente no mercado opções de manteigas funcionais, buscou-se desenvolver uma manteiga com probiótico encapsulado e com reduzido teor de sódio, por meio da adição de sal hipossódico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver manteiga com adição de bactéria probiótica encapsulada e sal hipossódico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Traçar um perfil de manteigas de marcas comerciais nacionais e importadas por meio de análises físico-químicas e perfil lipídico;
- Testar a viabilidade de probióticos comerciais por meio de testes de simulações gastrointestinais (testes *in vitro*);
- Encapsular, individualmente, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. bifidum* por meio da técnica de extrusão e avaliar a eficiência e o comportamento probiótico;
- Avaliar a viabilidade probiótica das cápsulas contendo *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. bifidum* por meio de vida de prateleira e testes de simulações gastrintestinais (testes *in vitro*);
- Caracterizar as cápsulas probióticas em relação às propriedades físico-químicas e morfológicas;
- Avaliar a influência da incorporação das cápsulas probióticas nas propriedades físicas, químicas e microbiológicas da manteiga, ao longo do seu período de armazenamento;
- Avaliar as manteigas probióticas desenvolvidas quanto a textura e a calorimetria diferencial de varredura;
- Avaliar a viabilidade probiótica do microrganismo encapsulado adicionado em manteiga por meio de testes de simulações gastrintestinais (testes *in vitro*);
- Avaliar a aceitação e a intenção de compra das manteigas desenvolvidas, por meio de análise sensorial.

3 DESENVOLVIMENTO

O desenvolvimento do estudo está apresentado na forma de revisão bibliográfica, nota técnica, manuscritos e depósito de pedido de patente.

3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.2 MANUSCRITO 1

Quality of commercial butters.

3.3 NOTA TÉCNICA 1

Análise sensorial para o desenvolvimento de manteiga adicionada de cápsulas probióticas.

3.4 MANUSCRITO 2

Encapsulação de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium bifidum* por extrusão, avaliação *in vitro* e caracterização das cápsulas probióticas.

3.5 MANUSCRITO 3

Perfil tecnológico e funcional de manteiga probiótica com sal hipossódico.

3.6 MANUSCRITO 4

Probióticos comerciais: teste *in vitro* para avaliar a eficiência no trato gastrointestinal.

3.7 DOCUMENTO DE PEDIDO DE PATENTE

Cápsula, uso da cápsula, manteiga e processo de obtenção da manteiga.

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT.

Solicitação realizada pela Universidade Federal de Santa Maria, por meio da Agência de Inovação e Transferência de Tecnologia (AGITTEC) junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPE).

Número do processo: BR 10 2019 004349 0

3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.1 Manteiga

A gordura é o componente mais variável do leite bovino e caracteriza-se por uma enorme complexidade, devido à presença de grande número de ácidos graxos essenciais e vitaminas, necessários na dieta humana, os quais atuam também como antioxidantes importantes para a saúde (BONOMI; LUCCAS; KIECKBUSCH, 2012). Além disso, exerce função vital, como estrutura da membrana celular e tem grande importância devido ao seu conteúdo energético (KONTKANEN et al., 2011).

Utilizada como matéria-prima na produção de derivados, a gordura do leite contribui com seu valor peculiar, para conferir melhores características organolépticas, como textura e sabor aos produtos (COSTA, 2011). Apresenta em sua composição quantidades consideráveis de ácidos graxos de cadeia curta (C4 - C12), sendo a única gordura a conter ácido butírico (C4:0) em quantidades elevadas. Estes ácidos graxos apresentam a característica de serem voláteis, o que proporciona grande parte do aroma e sabor de produtos lácteos, principalmente de manteiga e de queijos (ORDÓNEZ, 2005; BULDO; WIKING, 2016).

Uma das formas de consumo da gordura do leite é por meio de manteiga. Porém, o consumo de manteiga, nata e outros produtos lácteos com alto teor de gordura veio diminuindo nos últimos anos devido a uma imagem nutricional negativa, principalmente relacionada à crença de que o colesterol e os ácidos graxos saturados elevam os níveis de colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade) e aumentam o risco de desenvolver doenças cardíacas (HUTH; PARK, 2012, LOVERGROVE; GIVENS, 2016).

Ao contrário, estudos recentes mostram que alguns componentes da gordura do leite podem carregar efeitos hipocolesterolêmicos, anticancerígenos e antidiabéticos (PARODI, 2016, RODRÍGUEZ-ALCALÁ et al., 2017). Além disso, a ingestão de quantidades adequadas de derivados lácteos mostrou-se inversamente associada à síndrome metabólica (DREHMER et al., 2015). Apoiada por estes estudos, a gordura láctea está sendo reavaliada e tem havido um aumento no interesse e consumo de manteiga considerado como um “produto natural” (KRAUSE et al., 2007; MORTENSEN, 2011).

De acordo com a Portaria nº 146 de 1996, que apresenta o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Manteiga, manteiga é definida como o “produto gorduroso obtido exclusivamente pela bateção e malaxagem, com ou sem modificação biológica da nata pasteurizada derivada exclusivamente do leite de vaca, por processos tecnologicamente

adequados. A matéria gorda da manteiga deverá estar composta exclusivamente de gordura láctea” (BRASIL, 1996).

A manteiga é um produto gorduroso onde a fase aquosa está dispersa na fase oleosa, formando uma emulsão do tipo água/óleo. É formada pela batidura do creme, obtido previamente do desnate do leite (BULDO; KIRKENSGAARD; WIKING, 2013). Além disso, a legislação estabelece que a manteiga pode ser classificada como manteiga extra ou manteiga de primeira qualidade, recebendo uma das seguintes denominações para comercialização: manteiga ou manteiga sem sal, manteiga salgada ou manteiga com sal. Será manteiga maturada quando adicionada de fermento láctico. Entre os ingredientes obrigatórios está o creme pasteurizado obtido a partir do leite da vaca e como ingredientes opcionais o cloreto de sódio e fermentos lácticos selecionados (BRASIL, 1996).

A manteiga deve se apresentar com consistência sólida, pastosa à temperatura de 20 °C, de textura lisa uniforme, untosa, com distribuição uniforme de água (umidade), cor branco amarelada sem manchas ou pontos de outra coloração, com sabor suave, característico, aroma delicado, sem odor e sabor estranho. Podem ser adicionados corantes naturais ou sintéticos, idênticos aos naturais, em quantidade suficiente para obter o efeito desejado, sendo eles o beta caroteno e cúrcuma ou curcumina (BRASIL, 1996).

De acordo com o *Codex Alimentarius* e a legislação brasileira, este produto tem que apresentar, pelo menos, 80% de gordura (CODEX ALIMENTARIUS, 2007; BRASIL, 1996). A composição dos ácidos graxos da gordura do leite pode ser influenciada por fatores como: alimentação das vacas, fatores genéticos, fatores sazonais e fatores regionais (TZOMPA-SOSA; AKEN; HOOIJDONK; VALENBERG, 2014).

A Tabela 1 mostra os parâmetros físico-químicos que a manteiga brasileira deve apresentar para ser considerada de qualidade, conforme a Portaria nº 146 de 1996 (BRASIL, 1996).

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos exigidos pela Portaria nº 146 de 1996.

REQUISITOS	LIMITE (%)
Matéria gorda (%m/m)	Min. 82(*)
Umidade (%m/m)	Máx.16
Extrato seco desengordurado (%m/m)	Máx. 2
Acidez na gordura (milimoles/100g de matéria gorda)	Máx. 3
Índice de peróxido (meq. de peróxido/kg matéria gorda)	Máx. 1

(*) No caso de manteiga salgada a percentagem de matéria gorda não poderá ser inferior a 80%.

Fonte: Brasil (1996).

Na última década, a produção de manteiga aumentou de 4.660 milhões de toneladas para 5.202 milhões de toneladas e até 2023, espera-se um aumento de 24,05% na produção de manteiga. A Europa liderou a produção mundial de manteiga, com 66% entre 2000 e 2012, seguidos pelas Américas, Oceania, Ásia e África, com 16,7%, 8,3%, 7,1% e 2%, respectivamente. Os cinco maiores produtores mundiais, até o ano de 2012, foram Estados Unidos, Alemanha, França, Nova Zelândia e Federação Russa, sendo a Nova Zelândia o maior exportador mundial de manteiga com 0,35 milhão de toneladas e a França o país responsável pelo maior consumo *per capita* por ano. Por outro lado, o menor consumo *per capita*, indicado como abaixo de 1 kg *per capita* por ano, é relatado no México, Brasil, Colômbia, Grécia, Espanha, Irã, Israel, Turquia, Egito, África do Sul, China, Japão, Mongólia e Coreia do Sul (BULDO; WIKING, 2016). Esses dados ilustram o cenário para a manteiga fabricadas a partir de leite bovino. No entanto, o leite de búfalo, cabra, ovelha e camelo também são usados para fabricação de manteiga.

3.1.2 Probióticos

A busca por alimentos funcionais aumentou consideravelmente, uma vez que os alimentos passaram a ser vistos não somente como uma fonte de nutrientes, mas também como um promotor de bem-estar e saúde, devido à redução do risco de doenças (SIRÓ; KÁPOLNA; KÁPOLNA; LUGASI, 2008). Dentro deste contexto, os probióticos têm sido amplamente estudados para sua aplicação em alimentos.

As alegações funcionais atribuídas aos probióticos têm gerado grande interesse das indústrias, uma vez que representam um forte nicho entre os alimentos funcionais, e muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de incorporar estes microrganismos aos alimentos (HILL et al., 2014; HUANG et al., 2016). Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem uma série de benefícios à saúde do hospedeiro, cuja ingestão leva a importantes mudanças fisiológicas ao organismo, através do equilíbrio da microbiota intestinal (CORONA-HERNANDEZ et al., 2013; FAO/WHO, 2002).

Os microrganismos probióticos estão geralmente disponíveis como concentrados de cultura na forma seca (liofilizada) ou congelada para serem adicionados a um alimento para uso industrial ou doméstico. Estes podem ser consumidos como produtos alimentares (fermentados ou não fermentados) ou como suplementos dietéticos (produtos em pó, cápsulas ou comprimidos) (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Os probióticos são microrganismos vivos com capacidade de melhorar a microbiota intestinal trazendo benefícios à saúde do indivíduo. Nesse sentido, estes criam um ambiente favorável ao intestino, por meio dos seus mecanismos de ação, que dependerão de uma variedade de fatores, como o tipo da cepa utilizada, o hospedeiro e a alimentação. Entre os principais benefícios desses microrganismos destacam-se a manutenção dos sistemas digestivo e imunológico saudável (FAO/WHO, 2001; HILL et al., 2014).

Esses microrganismos podem melhorar a barreira epitelial promovendo a secreção de muco. Além disso, algumas cepas probióticas liberam peptídeos ativos, conhecidos também como bacteriocinas, que agem contra bactérias, fungos e vírus. Outras substâncias antimicrobianas também são produzidas pelos probióticos, como o ácido lático e acético que apresentam efeito inibitório em bactérias Gram-negativas. Dessa forma, os probióticos atuam de diversas maneiras interferindo na adesão dos patógenos na mucosa intestinal (BERMUDEZ-BRITO et al., 2012).

Atualmente inúmeros benefícios à saúde têm sido atribuídos à ingestão de probióticos, porém, um alimento vendido com alegações de trazer benefícios à saúde associado à adição de probióticos, deve conter um número de células viáveis de culturas probióticas de, pelo menos, 10^6 a 10^7 UFC/g (FAO/WHO, 2002), e para que ocorra ação benéfica no intestino, devem ser capazes de sobreviver as condições de processamento e armazenamento, além de ser ingeridos em quantidades adequadas, alcançando o número viável de microrganismos (CHAMPAGNE et al., 2011, SOHAIL et al., 2011). A ANVISA recomenda que a quantidade

mínima de probiótico deva estar entre $10^6 - 10^7$ UFC na porção diária ingerida do produto que os contenha (BRASIL, 2008).

Recomenda-se que os probióticos sejam adequados para produção industrial em grande escala, com a capacidade de sobreviver e manter sua funcionalidade durante a produção e armazenamento como culturas congeladas ou liofilizadas. Devem sobreviver durante as operações de processamento de alimentos em que adicionados (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Nos estudos sobre aplicação de probióticos em matrizes alimentares, a tolerância às condições ácidas do estômago e aos sais biliares são os principais requisitos de funcionalidade a serem avaliados, uma vez que o ambiente intestinal age como uma barreira física a esses microrganismos, ocasionando perda significativa na viabilidade (KAILASAPATHY, 2002).

Entretanto, o maior problema encontrado pelas indústrias na aplicação de bactérias probióticas em alimentos funcionais, está relacionado à manutenção e viabilidade destas culturas que podem não sobreviver em número suficientemente alto quando submetidas a determinadas condições, como por exemplo, o armazenamento em baixas temperaturas e a passagem pelo trato gastrointestinal humano (KAILASAPATHY; RYBKA, 1997).

Embora uma ampla variedade de gêneros e espécies de microrganismos sejam considerados probióticos potenciais, o uso de forma comercial em alimentos probióticos é predominantemente das bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Esses gêneros são habitantes dominantes no intestino humano (*Lactobacillus* no intestino delgado e *Bifidobacterium* no intestino grosso) (SAAD, 2006).

Entretanto, é importante ressaltar que nem todos os microrganismos pertencentes a esses gêneros são aprovados para aplicação em alimentos no Brasil. Dessa forma os probióticos aprovados para aplicação em alimentos são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei variedade rhamnosus*, *Lactobacillus casei variedade defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium* (BRASIL, 2017). O gênero *Lactobacillus* é predominante na lista de probióticos aprovados, apresentando mais de 100 espécies e subespécies com papel multifuncional para a produção de alimentos (GIRAFFA; CHANISHVILI; WIDYASTUTI, 2010).

O *Lactobacillus acidophilus* é uma das espécies mais conhecidas do gênero, estando presente no trato gastrointestinal. Esse microrganismo pode trazer diversos benefícios à saúde, como o tratamento de doenças gastrointestinais, competitividade com bactérias patogênicas,

redução da biossíntese do colesterol, inibição de enzimas bacterianas intestinais que transformam pré-carcinógenos em carcinógenos ativos, pré-digestão da lactose e atividade antimicrobiana (OZOGUL; HAMED, 2016).

O gênero *Lactobacillus* geralmente é mais resistente que o gênero *Bifidobacterium* em meio ácido, e também é encontrado naturalmente em produtos fermentados tradicionais, se adaptando bem em produtos lácteos (LEE; SALMINEN, 2009).

3.1.3 Alimentos Probióticos

Mais de 500 produtos alimentícios probióticos foram introduzidos no mercado global durante a última década, e essa inserção de novos produtos no mercado continua em expansão (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Os alimentos probióticos devem ser seguros e devem conter os organismos probióticos apropriados em quantidade suficiente no momento do consumo. A seleção das cepas probióticas adequadas em dose adequada é o primeiro requisito para o desenvolvimento de um produto alimentar probiótico. A viabilidade durante as operações de processamento e armazenamento, a sobrevivência durante o trânsito gastrointestinal e os potenciais benefícios à saúde dos consumidores são os critérios principais para seleção de cepas adequadas (BURGAIN; GAIANI; LINDER; SCHER, 2011).

Os benefícios do consumo de alimentos probióticos apenas são alcançados quando esses microrganismos chegam vivos e em quantidade adequada até o intestino, ou seja, a população bacteriana deve manter sua viabilidade durante a vida de prateleira e na passagem pelo sistema gastrointestinal. A regularidade do consumo de alimentos probióticos também é outro aspecto a ser considerado para o incremento da saúde (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

Entretanto, alguns fatores podem afetar a sobrevivência dos probióticos, como o conteúdo de gordura, tipo e concentração de proteínas, açúcares e pH (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010). A funcionalidade dos probióticos pode ser potencializada quando incorporados em alimentos, dependendo dos ingredientes e interações. Os produtos lácteos, em especial, são considerados a melhor matriz alimentícia para veiculação de probióticos devido as suas características físico-químicas (VINDEROLA et al., 2011).

Os alimentos probióticos são requisitados por melhorarem a qualidade de vida. No entanto, esses microrganismos são susceptíveis ao oxigênio, temperaturas elevadas e variações de pH, sendo desafiadora a diversificação desses produtos com doses adequadas de

probióticos para a indústria de alimentos (FÁVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011). Segundo Tripathi e Giri (2014), os probióticos podem ocasionar algumas alterações sensoriais no alimento devido à produção de componentes metabólicos.

O sucesso significativo foi alcançado durante as últimas décadas no desenvolvimento de produtos lácteos contendo bactérias probióticas, como leites fermentados, sorvetes, vários tipos de queijo, alimentos para bebês, leite em pó, sobremesas lácteas congeladas, bebidas à base de soro de leite, creme azedo, leiteiro, leite líquido normal e aromatizado (MOHAMMADI; MORTAZAVIAN, 2011).

Nesse sentido, é uma tendência de mercado à diversificação dos alimentos probióticos oferecidos, sendo que a elaboração de manteiga, aliada a adição de probióticos seria uma alternativa promissora aos consumidores.

3.1.4 Encapsulação de Probióticos

A viabilidade dos probióticos é de suma importância, uma vez que eles devem chegar e permanecer vivos no sítio de ação, para que possam desempenhar o seu papel na saúde dos consumidores (CHAMPAGNE et al., 2011). No entanto, trabalhos relatam que a sobrevivência de células probióticas, livres nos alimentos, é baixa (DE VOS et al., 2010). Tornando-se necessária a existência de uma barreira física, resistente às condições adversas do meio (KAILASAPATHY, 2009).

Zuidam e Shimoni (2010), definem microencapsulação como o empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas que liberam seu conteúdo de forma controlada e sob condições determinadas. Em suma, a microencapsulação surgiu como uma alternativa para aumentar a viabilidade das bactérias probióticas, tanto nos alimentos quanto durante a passagem pelo trato gastrointestinal, assim como controlar a liberação no aparelho digestivo (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007; HILL et al., 2014).

Diferentes procedimentos podem ser usados na encapsulação de probióticos, e cada um deles fornece microcápsulas com diferentes características. O tipo e a concentração do material de revestimento, o tamanho das partículas, o número de células bacterianas iniciais e a cepa bacteriana são alguns parâmetros relevantes no processo de microencapsulação (CHEN et al., 2017).

Os métodos de encapsulação mais utilizados são atomização, *spray drying*, emulsificação e extrusão, dentre outros (COOK et al., 2012). No entanto, nem todas essas técnicas são apropriadas para encapsulação de probióticos, devido à termossensibilidade das

bactérias e o tamanho considerável das partículas formadas. É importante atentar para esse fator, que pode variar de acordo com o processo de obtenção das partículas, da técnica de encapsulação, do material encapsulante e do recheio. Basicamente, a adição dessas partículas no alimento não deve prejudicar as características físicas e sensoriais do produto, como a textura, a estabilidade e o sabor (CHEN et al., 2017).

Nos últimos anos diversos métodos e materiais têm sido investigados para produção de micropartículas, tal como, a gelificação iônica utilizando polissacarídeos naturais como o alginato (PATIL et al., 2010). A gelificação iônica é uma técnica de microencapsulação simples, rápida, de fácil execução e de baixo custo (BAJPAI; TANKHIWALE, 2006) que ocorre quando uma solução polimérica é gotejada em uma solução iônica, geralmente cloreto de cálcio, que em concentrações adequadas irá formar instantaneamente micropartículas tridimensionais de diferentes formas e tamanhos, que englobam o núcleo encapsulado (DEVOS et al., 2010).

A técnica mais utilizada para obtenção de microcápsulas de alginato por gelificação iônica é a extrusão, por sua uniformidade de conformação e tamanho das partículas (PASIN; AZÓN; GARRIGA, 2012). A técnica consiste na geração de microgotas da solução de alginato, contendo o núcleo a ser encapsulado, que se formam ao passar por um dispositivo extrusor, com tamanho e velocidade de gotejo controlado. Essas microgotas caem sobre um banho que contém a fonte de íon divalente, ocorrendo a formação do hidrogel, por gelificação iônica externa (CHAN et al., 2010), conforme demonstrado na Figura 1.

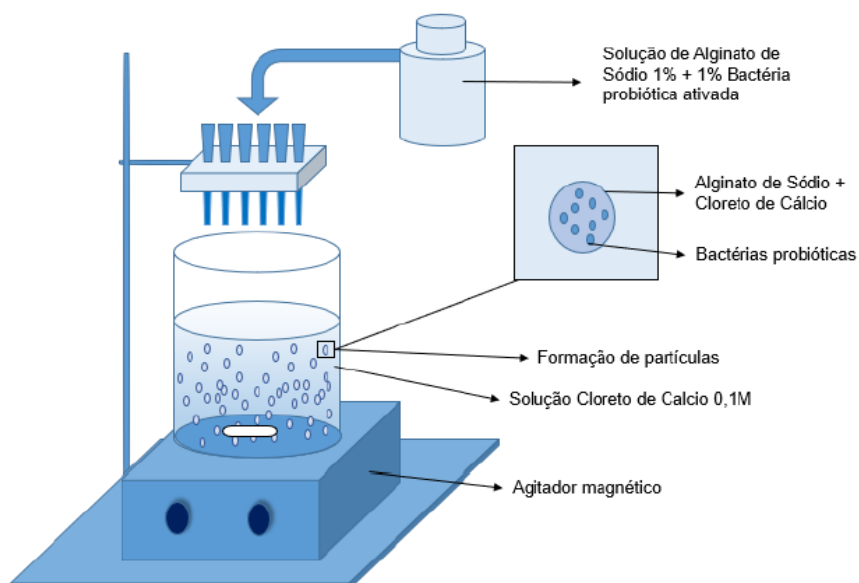


Figura 1 - Esquema da produção de cápsulas probióticas pelo método de encapsulação por extrusão.

Fonte: Autora.

As cápsulas formadas pela técnica de extrusão possuem o núcleo totalmente disperso na matriz encapsulante, podendo apresentar uma parte do material encapsulado na superfície da matriz. A forma de liberação do recheio pode ser parcial ou total e diferentes mecanismos podem ativar essa liberação, como pH, ação enzimática, osmolaridade, temperatura, ruptura mecânica, dentre outros (MAESTRELLI et al., 2008).

As partículas devem permanecer em torno de 30 minutos em contato com a solução iônica para atingir estabilidade e resistência mecânica. Além disso, o tempo que estas partículas permanecem nesta solução está diretamente relacionado com a espessura da parede da cápsula e conseqüentemente com a sua resistência à ruptura mecânica (PASQUALIM et al., 2010).

A principal limitação desta técnica é o tamanho considerável das cápsulas formadas, que irá depender do diâmetro do bico atomizador do equipamento de extrusão, da pressão do ar comprimido, da distância entre o bico atomizador e a solução iônica e do tempo necessário para que ocorra uma completa gelificação (MOFIDI et al., 2000). A Figura 2 demonstra as cápsulas formadas pelo processo de extrusão.



Figura 2 - Cápsulas com microrganismos encapsulados formadas pelo processo de extrusão. Imagem capturada por câmera fotográfica digital (Lumix Panasonic) com aumento de 5x.

Fonte: Autora.

O alginato é classificado quimicamente com um heteropolissacarídeo linear aniônico formado por dois monômeros: o ácido D - manurônico (M) e o ácido L - gulurônico (G), como mostra a Figura 3. Esses monômeros se distribuírem em partes, constituindo homopolímeros de blocos G ou M e heteropolímeros, com ambos blocos M e G (PASIN; AZÓN; GARRIGA, 2012).

A distribuição dos monômeros na cadeia polimérica e a carga conferem ao gel as características de flexibilidade ou rigidez. Se na sua estrutura há maior quantidade de blocos

G, geralmente o gel é rígido e frágil, enquanto que com a presença majoritária de blocos M o gel é macio e elástico (PASIN; AZÓN; GARRIGA, 2012).

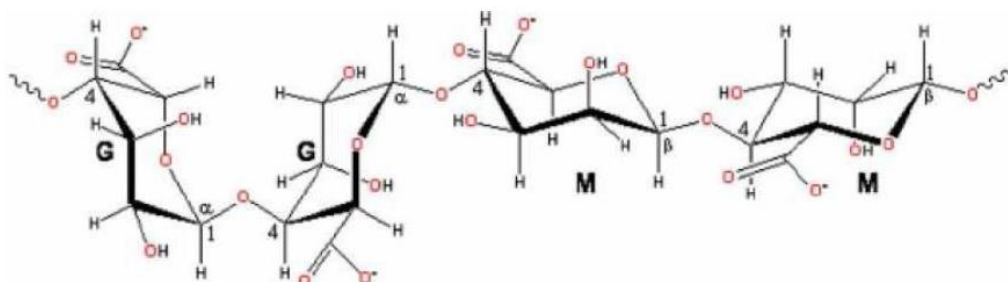


Figura 3 - Estrutura química do alginato com grupos de ácido L - gulurônico (G) e grupos de ácido D - manurônico (M).

Fonte: Souza Junior (2006).

Ao dissolverem-se em água, as moléculas do alginato são hidratadas e aumentam a viscosidade. Em solução ácida, os grupos carboxílicos dos ácidos urônicos recebem prótons e reforçam a ligação dos blocos G, formando géis de alta viscosidade e baixa solubilidade, em pH de 3,0 a 4,0 (LUPO; GONZÁLES; MAESTRO, 2012).

No processo de gelificação iônica ocorre a união entre duas moléculas distintas de alginato pelo enlaçamento dos monômeros G, que se dá através dos íons de cálcio. Como consequência desta união de moléculas, acontece um reordenamento estrutural resultando em um material sólido, com características de gel e estrutura química semelhante a uma caixa de ovos, assim definida por Draget (2007) (Figura 4). O grau de gelificação depende da hidratação do alginato, a concentração do íon cálcio e a quantidade de monômeros G.

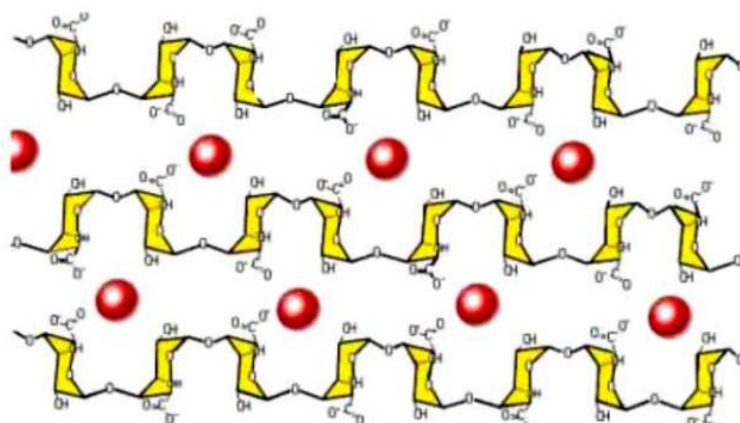


Figura 4 - Estrutura tridimensional do hidrogel de alginato, com interações entre íons Ca^{2+} e os grupos carboxílicos do alginato.

Fonte: Santos (2014).

Tanto o ácido algínico como seus sais de sódio, potássio, cálcio e amônio são considerados inócuos e seguros para utilização em alimentos, segundo a *Food And Drug Administration* (FDA). Estão listados também no *Codex Alimentarius* (FAO) e na *World Health Organization* (WHO), onde estão descritos os limites de ingestão diária do ácido algínico e seus sais para humanos, que é fixado em 50 mg Kg⁻¹ de peso corporal (FAO/WHO, 2001).

Os alginatos são sais do ácido algínico que podem ser formados com sódio, potássio, magnésio, cálcio, entre outros. Possuem diferentes graus de solubilidade em água, o que confere a viscosidade da solução (YABUR; HERNÁNDEZ, 2007). O alginato ao ser adicionado a um alimento prolonga a sua vida útil, reduz as alterações desenvolvidas durante seu armazenamento e atua como estabilizante, espessante, gelificante e formador de película.

O alginato é um ingrediente muito utilizado em sobremesas, produtos de confeitaria, sorvetes, condimentos e embutidos (ROMERO; MALO; PALOU, 2013). Devido a essas propriedades mencionadas anteriormente e a sua capacidade de proteger as células probióticas do estresse térmico, pH e oxigênio, além de ser atóxico, ter custo acessível, formar facilmente matriz ao redor das células bacterianas e ser aditivo aceito para alimentos, o alginato tem sido frequentemente utilizado para proteção de bactérias ácido-láticas (MARTÍN et al., 2013).

3.1.5 Sal Hipossódico

O consumo elevado de sal, e conseqüentemente de sódio, propicia o desenvolvimento e a elevação da pressão arterial na população mundial, causando hipertensão, considerado um problema de saúde pública por sua magnitude, risco e dificuldades no seu controle (HE; MACGREGOR, 2010). Tendo em vista essa perspectiva, a Organização Mundial de Saúde juntamente com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) recomendam estratégias para a redução do consumo de sal como um importante meio para prevenir infartos, acidentes vasculares cerebrais e outros eventos cardiovasculares (CAMPBELL et al., 2011). A maior parte do alto consumo de sódio provém de alimentos industrializados (IGNÁCIO, et al 2013).

O excesso do consumo de sal, é reconhecido como um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento do acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio (MOLINA et al., 2003). Muitos são os ingredientes que podem substituir o sal em um produto alimentício. Um deles é o cloreto de potássio (KCl), que possui propriedades similares ao cloreto de sódio (NaCl) e é reconhecido como seguro, podendo ser usado sem perda da

funcionalidade tecnológica do produto proporcionada pelo NaCl (IGNÁCIO, et al 2013; BRASIL, 1995).

Sal hipossódico é o produto elaborado a partir da mistura de cloreto de sódio com outros sais. De acordo com a legislação brasileira, sal com reduzido teor de sódio é o sal hipossódico que fornece no máximo 50% do teor de sódio contido na mesma quantidade de cloreto de sódio, de modo que a mistura final mantenha poder salgante semelhante ao do sal de mesa (BRASIL, 1995).

O sal *light* é um exemplo da utilização comercial do cloreto de potássio (KCl). Este sal de cozinha é composto por 50% de cloreto de sódio (NaCl) e 50% de cloreto de potássio (KCl) e apresenta redução de 50% do teor de sódio em comparação ao sal comum. A substituição parcial de cloreto de sódio (NaCl) por outro sal, em vez da simples redução de NaCl na formulação, oferece a oportunidade de manter a concentração de eletrólitos e, assim, auxiliar na conservação das características tecnológicas da massa (CARVALHO et al., 2013).

Dessa forma, o desenvolvimento de formulações de alimentos com cloreto de potássio, em substituição ao cloreto de sódio, também é fundamental para a produção de derivados lácteos.

3.2 MANUSCRITO 1

QUALITY OF COMMERCIAL BUTTERS

ABSTRACT

The consumption and consequent production of butter has increased considerably in recent years, which requires more studies on such a noble product. In order to know the butters sold in Brazil, the study had as objective to analyze butters of Brazilian, French, Italian and Argentine origin. The samples were analyzed for fat content, moisture, defatted dry extract, and total acidity for comparison with Brazilian legislation. The levels of chlorides, protein, ash, total dry extract, water activity, color and determination of the lipid profile were also determined. In all analyses, there was a statistically significant difference between the samples. Some samples showed disagreement with the quality requirements recommended in Brazilian legislation for commercialization. The predominant fatty acids in all samples were myristic acid (C14: 0), palmitic acid (C16: 0), stearic acid (C18: 0) and oleic acid (C18: 1n9). The regional influence, breed and handling of the animals and season of the year in which the milk was obtained and the butters produced, is suggested to be the main reason for the physical-chemical difference found between the samples.

KEY WORDS: Dairy products; Legislation of dairy products; Milk; Profile of fatty acids; Food quality.

1. Introduction

Dairy products are among the most consumed foods worldwide, and are studied for their own benefits to human health. Butter is an important derivative in the dairy industry because of its sensory attributes, as well as its versatility in the consumer's table. Butter is a mechanical fat agglomeration of 80% of fat (Codex Alimentarius 2006; Brasil 1996), about 15% water, 0,5% protein and 0,5% carbohydrates, besides liposoluble vitamins and minerals, becoming a product of high caloric and nutritive value (Silva 2015). Butter consumption has increased in the last few years, since the characteristics and quality of the sample has been the

subject of many researches (Barros et al. 2013; Fernandes et al. 2012, Gonçalves and Baggio 2012), mainly because of its benefits are being studied and exposed.

According to *Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal* (RIISPOA), which can be translated to “the Regulation of Industrial and Sanitary Inspection of Products of Animal Origin”, approved by Decree No. 9.013, of March 29, 2017 and Ordinance No. 146, of March 7, 1996, which establishes the Technical Regulation on Identity and Quality of Butter, defines butter as the fat milk product, which is found in the beat and the malaxation, with or without biological alteration of the cream of milk, by means of a specific process. The butter fat should be made exclusively of milkfat (Brasil 2017; Brasil 1996). Ordinance No. 146, dated March 7, 1996, of the Ministry of Agriculture and Livestock (MAPA), brings the Technical Regulation of Identity and Quality of butter, which fits the minimum quality characteristics that it must present. Furthermore, it provides that the cream for butter production is pasteurized and derived exclusively from cow's milk (Brasil 1996). For the purpose of the extension, Resolution No. 04 of June 28, 2000, establishes the "common butter" product, authorizing the use of the cream or milk product derived from skim or whey derived from the manufacture of cheeses (Brasil 2000).

It is known that fat is an important component for diets (Rodrigues 2002), not only for its vital function, but also as a source of cellular energy and for its energy content, for being a vehicle of fat-soluble vitamins and providing fatty acids (Gurr, Harwood and Frayn 2002). For a long time, foods of animal origin, such as butter, have been found in human life as precursors of cardiovascular diseases due to saturated fatty acid and cholesterol. However, studies have contributed to the reevaluation of dairy products, due to the potential benefits of milk fat, such as the presence of conjugated linoleic acid (CLA) (Méndez-Cid et al. 2017; Erkaya et al. 2015; Barros et al. 2013; Fernandes et al. 2012; Gonçalves and Baggio 2012; Ledoux et al. 2005; Gursoy et al. 2003).

The CLA isomers are important for human health, as they provide reduction in body fat accumulation, anticarcinogenic action, antiatherogenic, antidiabetogenic and immunomodulatory (Santos-Zago et al. 2008; Lopes et al. 2011; Bauman et al. 2001; Gursoy et al. 2003; Dewhurst et al. 2006; Gama 2010). Some sources of CLA in the human diet are dairy products and butter are found to be an average variation of 0.47 to 0.94% (Barros et al. 2013).

There is a wide variety of butters being commercialized, both Brazilian and imported. According to the Technical Regulation on Butter Identity and Quality (TRBI) (Brasil 1996), which establishes the quality criteria for butters sold in Brasil, the products must have a

maximum moisture content of 16% and a minimum fat content of 80% for butter with salt and 82% for butter unsalted.

In the interest of seeking information on the quality of butter, which is little studied, and draw a physical-chemical characterization of this product manufactured in several countries and marketed in Brazil, the objective of this study was to determine the physical and chemical parameters and fatty acids profile from Brazilian, French, Italian and Argentine butters marketed in Brazil and compare with the requirements of the Brazilian technical regulation.

2. Material and methods

Butters were purchased in hypermarkets and transported to the place where they were analyzed inside thermal boxes containing synthetic ice to guarantee the stability of the products, being kept at a temperature of up to 5 °C or as established in the labeling of the products. During the analysis period, the butters were stored in refrigeration, maintaining the maximum temperature of 5 °C.

It was analyzed 29 samples of brazilian-made and imported butters, salted and unsalted, from different commercial brands, of which 18 were Brazilian, with six products from Rio Grande do Sul, five from São Paulo, four from Paraná and three from Minas Gerais, eight from France, two from Argentina and one from Italy. All samples were submitted to be analyzed with a maximum of 30 days after the date of manufacture. The validity periods of the 29 samples ranged from 4 to 8 months. After opening the products, the analysis was completed in a maximum period of seven days.

The butters were divided in salted (14), receiving the acronym "AS" and unsalted (15), with the acronym "A". The salted butters were identified as follows: AS1, AS4, AS9, AS12 (origin RS / Brazil); AS2, AS3 (origin PR / Brazil); AS5 (origin MG / Brazil); AS6, AS8 (origin SP / Brazil); AS7, AS10, AS11, AS14 (France origin); AS13 (Argentine origin). Unsalted butters were given the following identification: A1, A6 (origin RS / Brazil); A2, A5, A10 (origin SP / Brazil); A3, A9 (PR origin / Brazil); A4 (Italy origin); A7, A11 (origin MG / Brazil); A8 (Argentine origin); A12, A13, A14, A15 (France origin).

The samples were submitted to physical-chemical analysis to determine the levels of fat, moisture, defatted dry extract (DDE) and total acidity, according to the requirements of Technical Regulation no. 146 of 1996 (Brasil 1996), and to complement the characterization, the determination of the protein, ash, chlorides and water activity contents was determined.

All analyses were performed in triplicates and following the methodologies recommended by the Association of Official Analytical Chemistry (AOAC, 2005).

For the determination of fat content, the method used is based on the extraction of cold fat using a mixture of three solvents, chloroform-methanol-water, in proportion in which the three solvents form a homogeneous solution. The moisture content was determined by the oven drying method at 105 °C until constant weight was obtained. The total acidity was determined by volumetric titration with 0.1 N sodium hydroxide solution (NaOH). The determination of the protein content was performed by the method of Micro Kjeldahl. The method used to determine the ash content was incineration, in muffle at 550 °C until total burning of the organic matter. Chloride content was determined by solvent digestion and subsequent titration with 0,1 mol. L⁻¹ silver nitrate (AOAC 2005). The water activity was measured directly through a water activity analyzer of the AquaLab brand, model 4TEV, at constant temperature of 25 °C.

Color analysis on the surface of refrigerated butters (5 °C) was carried out, in six times, according to the system of the International Commission of L'Éclairage (CIE), using the L^* , a^* and b^* coordinates through the Minolta® colorimeter (model CM-700d, Konica Minolta, Osaka, Japan), with illuminant A, 10° angle, reflectance measurement included (SCI), with a measuring area of 8 mm. The results were expressed as L^* (luminosity), a^* (where $-a^*$ represents direction to green and $+a^*$ direction to red), b^* (where $-b^*$ represents blue direction and $+b^*$ yellow direction).

The determination of the fatty acid profile of the butter samples was carried out in triplicate and followed the recommendations proposed by Hara and Radin (1978) for the extraction of lipids, the samples being dried and stored under freezing (-20 °C) until proceeding to the methylation step and determination of the fatty acid profile. Lipid methylation followed the methodology proposed by Christie (1982) and then subjected to chromatographic analysis.

The equipment used was an Agilent Technologies gas chromatograph, series 6890N, equipped with flame ionization detector (FID), Split injector and capillary silica fused silica, with the dimensions of 60 m in length, 0.25 mm internal diameter and 0.2 µm film thickness. Nitrogen was used as the entrainment gas. The sample volume injected was 1 µL. Fatty acids were identified by comparison to retention times of reference standards. The internal standard added was methyl tricosanoate in iso-octane. The quantification of fatty acids was determined according to Visentainer (2012).

The stratification of the results was performed in Microsoft Excel®, and analyzed according to a completely randomized design, applying descriptive analysis, analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test for multiple comparisons between the means, at a level of 5% significance. The statistical program used was SPSS® version 15.0. The development of the study took place at the Federal University of Santa Maria, in the Department of Food Science and Technology.

3. Results and discussion

In Brazil, for production and marketing, butter must comply with the TRBI, which establishes the quality parameters for butter, recommending a minimum fat content of 82%, for unsalted butter, and 80% for butter with salt. Maximum moisture should be 16%, DDE with a maximum limit of 2% and acidity should not exceed 3 mmol / 100g of fat (Brasil 1996).

In the statistical treatment of the data, the samples were distinguished into: samples with added salt and samples not added salt. None of the samples had dye added in their composition, according to labeling.

Table 1 presents the results of the physical-chemical analysis of the salt butters, totaling 14 samples, of which five samples (three French, one from Argentina and one Brazilian) had a lower fat content than that recommended by Brazilian legislation and higher moisture content. Only one sample (French) presented adequate values for DDE.

The added salt content should not exceed 2%, according to Ordinance 146/1996 (Brasil 1996), and all the samples denominated “salted”, according to the labeling information, do not present higher levels for the analysis of chlorides, ranging from 0.54 to 1.80% (Table 1), all of which are in accordance with Brazilian legislation. Regarding protein contents, the samples with salt obtained minimum values of 0.34 and maximum of 2.13%. Salt-free samples had levels ranging from 0.36 to 2.01% protein. The ash contents ranged from 0.02 to 2.28 for the samples with salt and from 0.02 to 0.55 for the unsalted butters.

Table 2 shows the results of the physical-chemical analysis of the 15 samples of unsalted butter, with five samples (three French, one from Argentina and one Brazilian) being in disagreement with TRBI for fat content and three samples (two Brazilian and French) presented higher values for humidity. For DDE, eight samples had adequate values of at most 2%.

The literature is scarce for butters, moreover, most countries do not have a specific regulation to evaluate the quality of this product. With the studies found, it is possible to perceive some similarity with the present study, showing that there is no standardization in the manufacture of butters, and that do not meet the parameters required by the technical regulations. A study carried out with butters produced in the state of Khartoum, Sudan, and butters imported from Egypt and New Zealand, found that the physical-chemical parameters were not in accordance with local legislation, and the samples had mainly humidity above recommended (16%) (Ahmed 2011).

In 120 samples of butters marketed in Iran and compared to the required quality protocols in the country, the results showed that 91.7% of the samples were outside the Iranian national quality standard (Ghasemloy Incheh et al. 2017).

Eight brands of butters marketed in the state of Minas Gerais, Brazil, moisture contents varied from 13.69 to 30.47%, fat from 67.58 to 84.32%, chlorides from 0.01 to 0.24%, ashes from 0.13 to 5.12%, DDE from 1.92 to 3.52% and acidity from 0.84 to 4.54 mmol / 100g (Fernandes et al. 2012), showing irregularities in all parameters when compared to the Brazilian TRBI.

Analyzing ten different brands of butters commercialized in the city of Viçosa, Minas Gerais, Brazil, the moisture content varied from 11.51% to 23.97%, fat from 68.36 to 85.85%, DDE from 0.56 and 6.25% and the acidity ranged from 0.94 to 4.11 mL / 100g, the chloride contents found for common butter ranged from 0.45% to 1.98% and for extra butter of 1.21% to 2.88% (Silva et al. 2009), where butters were found in disagreement with the Brazilian TRBI. Since, for butters to be marketed in Brazil, they must comply with the requirements of the TRBI for butter, Portaria 146/1996 (Brazil 1996), and the studies show irregularities in the minimum quality parameters of that product, which would prevent the sale of butters that do not meet these requirements for minimum and maximum levels of moisture, fat, DDE and acidity.

All 29 samples from this study, salted and unsalted, presented adequate values for acidity, as required by Brazilian legislation, TRBI. The water activity of the samples evaluated presented an average of 0.96 for the samples salted and unsalted, being considered a normal value for butters (Table 1 and 2).

The values found for color, corroborate with the results found in the study by Méndez-Cid et al. (2017), which evaluated the color of butter during storage for nine months. The results showed high brightness value (L^*) and indication for the direction of the green color, according to the coordinate a^* , and direction to yellow according to the coordinate b^* .

In all analyses, for salted and unsalted butters, there was a statistically significant difference in all the parameters, which determines the great challenge between the samples, being it could be in the raw material and in the production. There are factors that influence the characteristics and composition of milk and milk fatty acids, such as cow's milk (Clapperton and Banks 1985), genetic factors (Grummer 1991), seasonal factors (Hinrichs and Heineman Kessler 1992) and regional factors (Werner, Luedecke and Shultz 1992).

Among the fatty acids detected, C16: 0 (palmitic acid), C18: 1n9 (cis-9,12) (oleic acid), C14: 0 (myristic acid) and C18: 0 (stearic acid) in the composition of the salted and unsalted butters evaluated in this study. However, there was a significant difference in the fatty acid content between the samples (Tables 3, 4, 5 and 6).

The CLA content found in the 29 samples evaluated corroborates with that detected by other authors, mentioned next, and for the samples of butter with salt, the contents varied from 0.33 to 0.73%, and for the samples of butter without salt, contents between 0.55 and 0.73% were detected (Table 4 and 6).

Samet-Bali, Ayadi and Attia (2009) developed and evaluated traditional Tunisian salted butter. The average fat content was 65.7%, being lower than the minimum content found in the present study, chlorides 0.29%, acidity 2.25 mmol / 100g and protein 1.10%. The mean water activity was 0.79, which value is lower than found, which can provide a longer shelf life to the product. The main fatty acids found in the butter samples were C14: 0, C16: 0, C18: 0 and C18: 1n9 (cis-9,12). The values found corroborate with the results presented by this study, as well as in the work of Ledoux et al. (2005), who analyzed 54 French butters for a year, and found that the average annual fat content of butters was 83.6%, mean levels of CLA were 0.45 g CLA / 100 g in winter butter (butter made from milk produced in January or February), 0.58 g CLA / 100 g in spring butter (butter made from milk produced in March or April) and 0.80 g CLA / 100 g in summer butter (butter made from milk produced in May, June or July).

These results contribute to explain the statistical difference found in the present study, that is, the strong regional interference of different races and animal husbandry, and the season of the year in which the milk is obtained and later the butter.

Other studies confirm these statistical differences, as in this one where 16 samples of butters were analyzed, and it was found that the acidity ranged from 0.52 to 0.66 mmol / 100g, the humidity from 18.33 to 19.48%, and the fat contents from 83.5 to 85.9%; the fatty acids found in the highest concentration in the butter were C16: 0 with 36.4%, C18: 1n9 (cis-9,12) with 13.6%, C14: 0 with 12.5%, C18: 0 with 7, 1% and C4: 0 with 3.5% (Barros et al.

2013). In a study that analyzed seven brands of butter, the acidity found ranged from 0.76 to 2.03 mmol / 100g, the minimum and maximum levels found in the different brands for moisture were 11.31 and 19.97%, respectively. Chlorides were 0.14 and 2.21%; the range found for the main fatty acids were: C14: 0 (9.7 to 12.1%), C16: 0 (22.0 to 26.1%), C18: 0 (9.6 to 11.7%) and C18: 1n9 (21.9 to 24.2%) (Augusta and Santana 1998). The fatty acid profile remains stable in the studies found, varying the content found for each fatty acid.

A study that analyzed eleven samples of commercial butters at six different moments, totaling 66 samples, six of them from Brazil, three from France and two from Argentina, showed that the total lipids varied from 81.8% to 86.8%, the contents of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids varied from 43.86% to 52.74%, from 21.65% to 23.34% and from 2.11% to 2.89%, respectively, the CLA levels ranged from 0.56% to 0.86% and for saturated fatty acids, the most abundant in the butters evaluated was C16: 0, C18: 0 and C14: 0 (Gonçalves and Baggio 2012). The difference in the CLA content found in the samples presented in the literature and in this study, is related to seasonal and regional influences.

Méndez-Cid et al. (2017) developed salted and unsalted butters in France and evaluated the composition and quantification of fatty acids and their alteration during the shelf life of the products. In this study, the total dry extract of the unsalted fresh butter was 84.2% and with salt of 86.5%, the fat found was 92.0% for the fresh butter without salt and 90.7% for the fresh butter with salt. In the butter, immediately after manufacture, the fatty acid found in the highest concentration was C16: 0 (33%), followed by C18: 1n-9 (cis-9,12) (24.8%), C14: 11.5%), C 18: 0 (9.8%), C 12: 0 (3.5%), C 10: 0 (2.8%), C 4: 0 (2.4%) and CLA (0.72%).

The present study contributes to the knowledge of the characteristics of Brazilian, French, Italian and Argentine butters marketed in Brazil, showing the great difference in the physical-chemical composition that exists among the 29 brands. The results found in the study show a great disregard of commercial butter with the RTIQ of butter, which shows the minimum parameters of product quality, which leads to the conclusion that there are several butters being marketed in the country that are in disagreement with the legislation that regulates production and marketing.

These results bring the discussion about the importance of a revision in the Brazilian dairy legislation, as well as a better inspection, not only to ban products but to carry out an evaluation on the quality of national and imported butter, and may be legally allowed, the marketing of butters having different physical-chemical characteristics and maintaining

sanitary quality, since the physico-chemical alteration of the product can interfere in the microbiological aspects of the butter, which can cause in a shorter shelf life. The reformulation of the legislation may also contribute to add value to the product, which through modern legislation and that meets new products, butters with additions of special and functional ingredients may be added to the market, such as encapsulated probiotic microorganisms, essential oils, spices and seasonings and even jellies.

4. Conclusion

The comparison with Brazilian legislation is extremely important, because it is necessary to know the national and imported products that are being marketed in the country, and especially its quality, because that is what quality standards and food laws are for. All the analyzed butters presented irregularity with at least one of the mandatory quality parameters (TRBI), being they fat, humidity or DDE.

The fatty acids composition of butters also showed a significant statistically differences between the samples, showing that butters are strongly affected by seasonal, regional, breed and animal influences, among others. However, the predominant fatty acids are the same between national and imported brands, such as palmitic acid (C16: 0), oleic acid (C18: 1n9 cis-9), stearic acid (C18: 0) and myristic (C14: 0).

This study exposes the importance of a review of the Brazilian legislation regarding the quality parameters of butter, since we emphasize that many butters are being marketed outside the required parameters, however, they are good quality products that meet the requirements of the market and the consumer.

Acknowledgements

Acknowledgement to *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) for granting a scholarship.

References

Ahmed SS (2011) Characteristics of Butter Processed in Khartoum State. 282p. University of Khartoum in Fulfillment. Department of Dairy Production.

AOAC (2005) Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists. (18th ed.). Gaithersburg, Maryland.

Augusta IM and Santana DMN (1998) Evaluation of the quality of extra type butters sold in the state of Rio de Janeiro. *Ciênc Tecnol Aliment*, 18 (4).

Barros PAV, Glória MBA, Lopes FCF, Gama MAS, Souza SM, Mourthé MHF and Leão MI (2013) Nutritional quality and oxidative stability of butters produced from the milk of cows fed sugarcane supplemented with sunflower oil. *Arq Bras Med Vet Zootec* 65(5):1545-1553.

Bauman DE et al. (2001) Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proceedings of the American Society of Animal Science*, 41:215-227.

Brasil (1996) Ordinance n. 146 of March 7, 1996 from the Ministry of Agriculture Livestock and Supply. *Official Journal of the Union, Brasília, DF, March 11, 1996. Section 1, p. 3977. Technical Regulation of Identity and Quality of Butter.*

Brasil (2000) Resolution n° 04, of June 28, 2000. Institutes the product called Common Butter. *Official Journal of the Union, July 05, 2000.*

Brasil (2017) Decree No. 9,013 of March 29, 2017. Provides for the Regulation of the industrial and sanitary inspection of products of animal origin (RIISPOA).

Christie WW (1982) A simple procedure for rapid transmethylation of glicerolipids and cholesterol esters. *J Lipid Res*, 23:1072.

Clapperton JL and Banks W (1985) Factors affecting the yield of milk and its constituents, particularly fatty acids, when dairy cows consume diets containing added fat. *J Sci Food Agric*, 36:1205-1212.

Codex Alimentarius (2006) Codex Standard for Butter. Codex Standard 279-1971 12 Formerly Codex Stan A-1-1971. Adopted in 1971. Revision 1999. Amendment 2003.

- Dewhurst RJ, Shingfield KJ, Lee MRF and Scollan ND (2006) Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Anim Feed Sci Technol*, 131:168–206.
- Erkaya T et al. (2015) Probiotic butter: stability, free fatty acid composition and some quality parameters during refrigerated storage. *Int Dairy J*, 49:102-110.
- Fernandes RVB et al. (2012) Evaluation of the physical-chemical parameters of butters of the common type. *Rev Acad Ciênc Agrár Ambient*, 10(2):171-176.
- Gama MAS (2010) Production of milk with high content of conjugated linoleic acid (CLA). In: 11th Pan-American Milk Congress, 2010, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte.
- Gonçalves MFD and Baggio SR (2012) Evaluation of quality of butter from different provenance. *Ciênc Tecnol Aliment*, Campinas, 32(3):629-635.
- Grummer RR (1991) Effect of feed on the composition of milk. *J Dairy Sci*, 74, 3244-3256.
- Gurr MI, Harwood JL and Frayn K (2002) *Lipid biochemistry*. London, Blackwells.
- Gursoy O et al. (2003) Conjugated linoleic acid (CLA) content of most popular Turkish hard and soft cheeses. *Milchwissenschaft*, 58(11-12):622-623.
- Hara A and Radin NS (1978) Lipid extraction of tissues of low toxicity solvent. *Anal biochem*, 90:420-426.
- Hinrichs J, Heineman U and Kessler HG (1992) Differences in the composition of triglycerides in summer and winter milk fat. *Milchwissenschaft*, 47:495-498.
- Ghasemloy Incheh KH, Hassanzadazar H, Forouzan SH, Banafshehchin El, Mozafarian E, Aminzare M and Hashemi M (2017) A survey on the quality of traditional butters produced in West Azerbaijan province, Iran. *Intern Food Res J*, 24(1):327-332.

Ledoux M, Chadigny JM, Darbois M, Soustre Y, Sébédio JL, and Laloux L (2005) Fatty acid composition of French butters, with special emphasis on conjugated linoleic acid (CLA) isomers. *J Food Composit Anal*, 18:409-425.

Lopes FCF, Gama MAS, Ribeiro CGS et al. (2011) Production of milk with high CLA content. Brazilian experience. In: Pereira LGR, Nobre MM et al. (Org.). *Research, development and innovation for the sustainability of dairy cattle*. Juiz de Fora, MG: Embrapa Milk Cattle, 251-296.

Méndez-Cid FJ, Centeno JA, Martínez S and Carballo J (2017) Changes in the chemical and physical characteristics of cow's milk butter during storage: Effects of temperature and addition of salt. *J Food Composit Anal*, 63:121-132.

Rodrigues JN (2002) Restructuring by mixtures and interesterification of milk fat and corn oil. 89f. Dissertation (Master in Pharmaceutical Sciences), University of São Paulo.

Samet-Bali O, Ayadi MA and Attia H (2009) Traditional Tunisian butter: Physical-chemical and microbial characteristics and storage stability of the oil fraction. *LWT - Food Sci Technol*, 42:899-905.

Santos-Zago LF, Botelho AP and Oliveira AV (2008) Os efeitos do ácido linoléico conjugado no metabolismo animal: avanço das pesquisas e perspectivas para o futuro. *Rev Nut*, 21:195-221.

Silva FT (2015) Butter. Brazilian Agricultural Research Corporation - Embrapa Technological Information Agency. Available in http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000girl717f3902wx5ok05vadr1ty2i4zd.html#

Silva LCA et al. (2009) Study of the quality of butters by alkaline phosphatase and physical-chemical analyses. *Rev Inst Latic Când Tost*, 64(367-368):42-47.

Visentainer V (2012) Analytical aspects of the flame ionization detector response for fatty acid esters in biodiesel and food. *Quím Nov*, 35:274-279.

Werner SA, Luedecke LO and Shultz TD (1992) Determination of conjugated linoleic acid content and isomer distribution in three Cheddar-type cheeses: effects of cheese cultures, processing, and aging. *J Agricul Food Chemist*, 40:1817-1821.

Table 1 – Average results of the physical-chemical analysis of the samples of national-made butter and imported trademarks, salted.

Sample	Fats (%)	Moisture (%)	Chlorides (%)	Acidity (mmol/100g)	DDE (%)	Protein (%)	Ashes (%)	Aw (%)	TDE (%)	Color		
										a*	b*	L*
AS1	82.93±0.3 ^{ab}	14.34±0.3 ^{def}	0.76±0.0 ^g	1.90±0.7 ^{abc}	2.73±0.5 ^{fg}	0.34±0.0 ^g	0.99±0.0 ^d	0.95±0.0 ^a	85.66±0.3 ^{bcd}	-5.13 ^h	30.45 ^f	88.83 ^{abc}
AS2	80.69±0.2 ^{de}	14.14±0.2 ^{def}	1.56±0.0 ^{bc}	1.60±0.1 ^c	5.17±0.4 ^{cde}	1.49±0.2 ^{bc}	1.53±0.0 ^c	0.96±0.0 ^a	85.86±0.2 ^{bcd}	-8.09 ^{ab}	40.48 ^b	83.14 ^{de}
AS3	81.18±0.7 ^{cde}	13.32±0.4 ^{fg}	1.59±0.0 ^{bc}	1.71±0.1 ^{bc}	5.50±0.9 ^{bcd}	1.11±0.0 ^{cde}	1.50±0.1 ^c	0.96±0.0 ^a	86.68±0.4 ^{ab}	-6.68 ^{ef}	33.56 ^e	91.39 ^{ab}
AS4	80.58±0.1 ^e	13.56±0.2 ^{defg}	0.54±0.1 ^h	1.74±0.2 ^{bc}	5.87±0.4 ^{bcd}	1.73±0.2 ^{ab}	0.48±0.0 ^e	0.96±0.0 ^a	86.44±0.2 ^{abcd}	-7.41 ^{cd}	37.62 ^c	89.59 ^{abc}
AS5	82.44±0.5 ^{abc}	14.86±0.7 ^{de}	1.54±0.0 ^{bcd}	1.91±0.1 ^{abc}	2.70±0.3 ^{fg}	0.89±0.1 ^{ef}	1.46±0.2 ^c	0.95±0.0 ^a	85.14±0.7 ^{cd}	-8.59 ^a	43.06 ^a	83.51 ^{de}
AS6	83.51±0.4 ^a	12.19±0.7 ^g	1.37±0.0 ^e	1.53±0.4 ^c	4.30±0.9 ^{def}	1.69±0.2 ^{ab}	1.31±0.0 ^c	0.96±0.0 ^a	87.81±0.7 ^a	-7.08 ^{cde}	36.97 ^c	82.82 ^{de}
AS7	82.84±0.2 ^{ab}	13.50±0.4 ^{efg}	1.80±0.0 ^a	1.87±0.0 ^{bc}	3.66±0.3 ^{efg}	1.74±0.3 ^{ab}	1.40±0.3 ^c	0.96±0.0 ^a	86.50±0.4 ^{abc}	-6.48 ^f	35.68 ^{cde}	87.77 ^{abc}
AS8	83.23±0.1 ^{ab}	14.88±0.1 ^{de}	1.10±0.1 ^f	2.05±0.1 ^{ab}	1.89±0.0 ^g	0.56±0.0 ^{fg}	1.25±0.0 ^{cd}	0.95±0.0 ^a	85.12±0.1 ^{cd}	-6.75 ^{ef}	36.04 ^{cd}	80.46 ^{fg}
AS9	82.06±0.7 ^{bcd}	14.80±0.5 ^{def}	1.67±0.0 ^{ab}	1.72±0.1 ^{bc}	3.14±0.2 ^{fg}	1.04±0.0 ^{cde}	1.96±0.0 ^b	0.96±0.0 ^a	85.20±0.5 ^{bcd}	-7.49 ^{bc}	36.50 ^c	78.53 ^g
AS10	73.35±0.5 ^g	19.18±0.5 ^{ab}	1.64±0.1 ^{abc}	2.06±0.1 ^{ab}	7.47±0.5 ^b	1.16±0.2 ^{cde}	0.71±0.0 ^e	0.96±0.0 ^a	80.82±0.5 ^{fg}	-3.45 ^f	21.72 ^g	92.59 ^a
AS11	77.31±0.4 ^f	18.67±0.2 ^b	1.50±0.1 ^{bcd}	1.79±0.1 ^{bc}	4.02±0.3 ^{def}	1.65±0.2 ^b	2.28±0.1 ^a	0.95±0.0 ^a	81.33±0.2 ^f	-6.97 ^{cd}	33.81 ^{de}	88.45 ^{abc}
AS12	72.56±0.4 ^g	20.28±0.4 ^a	1.61±0.1 ^{bc}	2.07±0.1 ^{ab}	7.15±0.7 ^{bc}	2.13±0.2 ^a	1.01±0.0 ^d	0.97±0.0 ^a	79.72±0.4 ^g	-7.18 ^{cde}	36.81 ^c	83.95 ^{cde}
AS13	71.09±0.9 ^h	15.00±0.6 ^d	1.38±0.0 ^{de}	2.29±0.0 ^a	13.91±0.9 ^a	0.93±0.0 ^{def}	1.84±0.0 ^b	0.97±0.0 ^a	85.00±0.6 ^d	-6.82 ^{df}	35.73 ^{cde}	86.30 ^{bcd}
AS14	68.53±0.3 ⁱ	17.05±0.9 ^c	1.49±0.0 ^{cde}	1.55±0.0 ^c	14.43±0.9 ^a	1.36±0.1 ^{bcd}	0.02±0.0 ^f	0.96±0.0 ^a	82.95±0.1 ^e	-6.39 ^f	30.43 ^f	82.64 ^{efg}
C.V. (%)	0.59	3.23	4.05	7.48	11.41	11.90	7.41	1.27	0.59	6.61	4.62	5.05

Results presented by the average of the triplicates followed \pm standard deviation. Color presents the average values for a six-fold. The values in the same column, with equal letters, were not significant at the 5% level.

Tags: DDE (Defatted Dry Extract); Aw (Water activity); TDE (Total Dry Extract); C.V. (Coefficient of variation).

Table 2 – Average results of the physical-chemical analysis of the butter samples of national and imported trademarks, unsalted.

Sample	Fats (%)	Moisture (%)	Chlorides (%)	Acidity (mmol/100g)	DDE (%)	Protein (%)	Ashes (%)	Aw (%)	TDE (%)	Color		
										a*	b*	L*
A1	84.87±0.1 ^{ab}	13.63±0.5 ^{ef}	0.05±0.0 ^{cd}	1.72±1.4 ^{ef}	1.49±0.4 ^{ef}	0.55±0.0 ^d	0.49±0.0 ^{ab}	0.98±0.0 ^{abc}	86.37±0.4 ^{bc}	-7.60 ^{bc}	37.62 ^{bc}	89.44 ^{ab}
A2	83.70±0.6 ^{bcd}	14.27±0.4 ^{def}	0.03±0.0 ^{cd}	2.55±0.4 ^b	2.03±0.3 ^{def}	0.63±0.0 ^d	0.50±0.0 ^{ab}	0.97±0.0 ^a	85.73±0.3 ^{bcd}	-6.58 ^{ef}	31.76 ^{fg}	92.57 ^a
A3	79.38±0.2 ^g	13.87±0.2 ^{ef}	0.05±0.0 ^{cd}	1.67±0.2 ^{efg}	6.75±0.3 ^b	0.54±0.0 ^d	0.45±0.0 ^b	0.96±0.0 ^{ab}	86.13±0.2 ^{bc}	-7.10 ^d	34.92 ^{de}	91.06 ^{ab}
A4	82.98±0.2 ^{de}	14.66±0.4 ^{de}	0.02±0.0 ^d	2.27±1.2 ^{bc}	2.36±0.4 ^{cdef}	0.70±0.0 ^{cd}	0.55±0.0 ^a	0.96±0.0 ^a	85.34±0.3 ^{cd}	-3.48 ^k	20.88 ^j	87.20 ^{abc}
A5	82.42±0.3 ^{ef}	14.20±0.8 ^{ef}	0.06±0.0 ^{bc}	1.50±0.9 ^{fgh}	3.38±0.9 ^{cd}	0.36±0.0 ^d	0.55±0.0 ^a	0.97±0.0 ^{bcd}	85.80±0.8 ^{bc}	-4.69 ^j	26.25 ⁱ	91.95 ^a
A6	82.75±0.6 ^{def}	16.14±0.0 ^{bc}	0.04±0.0 ^{cd}	1.71±0.6 ^{ef}	1.10±0.5 ^f	0.55±0.0 ^d	0.07±0.0 ^e	0.96±0.0 ^{ab}	83.86±0.0 ^{ef}	-7.25 ^{cd}	36.32 ^{cd}	85.83 ^{bc}
A7	82.54±0.5 ^{def}	16.63±0.3 ^b	0.05±0.0 ^{cd}	1.25±1.14 ^h	0.83±0.3 ^f	0.60±0.1 ^d	0.03±0.0 ^e	0.96±0.0 ^{cd}	83.37±0.2 ^f	-6.94 ^{de}	35.92 ^{cd}	90.93 ^{ab}
A8	79.91±0.5 ^g	13.86±0.7 ^{ef}	0.21±0.0 ^a	1.76±0.01 ^{ef}	6.23±1.1 ^b	1.30±0.3 ^b	0.26±0.0 ^{cd}	0.96±0.0 ^{de}	86.14±0.6 ^{bc}	-6.63 ^{ef}	33.52 ^{ef}	83.01 ^c
A9	83.52±0.5 ^{cde}	13.46±0.3 ^{fg}	0.04±0.0 ^{cd}	1.88±0.07 ^{de}	3.01±0.3 ^{cde}	0.36±0.2 ^d	0.04±0.0 ^e	0.97±0.0 ^{bcd}	86.54±0.3 ^{ab}	-7.82 ^b	38.78 ^b	88.87 ^{ab}
A10	84.56±0.5 ^{abc}	13.87±0.2 ^{ef}	0.04±0.0 ^{cd}	1.37±0.13 ^{gh}	1.57±1.5 ^{ef}	1.22±0.2 ^{bc}	0.04±0.0 ^e	0.96±0.0 ^d	86.13±0.2 ^{bc}	-6.38 ^{fg}	32.15 ^{fg}	88.92 ^{ab}
A11	85.66±0.5 ^a	12.31±0.5 ^g	0.09±0.0 ^b	2.93±0.05 ^a	2.03±0.0 ^{def}	1.67±0.0 ^{ab}	0.22±0.0 ^{cd}	0.97±0.0 ^{bcd}	87.69±0.4 ^a	-8.53 ^a	43.17 ^a	89.94 ^{ab}
A12	81.72±0.2 ^f	14.62±0.2 ^{def}	0.05±0.0 ^{cd}	2.11±0.01 ^{cd}	3.66±0.2 ^c	1.36±0.3 ^b	0.26±0.0 ^c	0.96±0.0 ^{de}	85.38±0.1 ^{bcd}	-5.17 ⁱ	27.27 ⁱ	91.80 ^a
A13	82.79±0.2 ^{def}	15.42±0.3 ^{cd}	0.04±0.0 ^{cd}	1.94±0.04 ^{de}	1.79±0.2 ^{def}	1.32±0.3 ^b	0.18±0.0 ^d	0.96±0.0 ^{cd}	84.58±0.3 ^{de}	-5.80 ^h	29.45 ^h	91.69 ^a
A14	79.45±0.8 ^g	14.60±0.1 ^{def}	0.03±0.0 ^{cd}	2.10±0.09 ^{cd}	5.95±0.8 ^b	2.01±0.0 ^a	0.21±0.0 ^{cd}	0.95±0.0 ^{de}	85.40±0.1 ^{bcd}	-6.02 ^{gh}	31.64 ^g	89.84 ^{ab}
A15	71.64±0.9 ^h	18.32±0.4 ^a	0.05±0.0 ^{cd}	1.82±0.08 ^{de}	10.04±0.3 ^a	1.46±0.2 ^{ab}	0.02±0.0 ^e	0.94±0.0 ^e	81.68±0.4 ^g	-6.31 ^{fg}	34.70 ^{de}	89.33 ^{ab}
C.V. (%)	0.51	2.70	18.68	5.44	15.44	18.86	10.58	0.77	0.46	4.87	3.85	4.32

Results presented by the average of the triplicates followed \pm standard deviation. Color presents the average values for a six-fold. The values in the same column, with equal letters, were not significant at the 5% level.

Tags: DDE (Defatted Dry Extract); Aw (Water activity); TDE (Total Dry Extract); C.V. (Coefficient of variation).

Table 3 – Profile of fatty acids (g.100 g⁻¹) in samples of national and imported salted butters.

Sample	C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C14:1	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0
AS1	2.09±0.03 ^{bcde}	3.07±0.11 ^a	2.02±0.07 ^a	5.37±0.09 ^a	6.01±0.06 ^a	21.15±0.06 ^a	1.47±0.05 ^a	2.03±0.06 ^a	60.78±1.22 ^a	2.56±0.06 ^b	0.93±0.14 ^{ab}
AS2	2.67±0.12 ^a	2.44±0.29 ^{ab}	1.27±0.39 ^{bc}	2.87±0.81 ^b	3.41±0.85 ^{bc}	12.86±3.03 ^b	1.03±0.27 ^{ab}	1.27±0.35 ^b	36.41±4.90 ^b	1.76±0.43 ^b	0.72±0.21 ^b
AS3	2.14±0.03 ^{bcde}	2.01±0.13 ^{bc}	1.25±0.42 ^{bc}	2.37±0.68 ^{bc}	2.73±0.79 ^{bcd}	10.13±1.03 ^{bc}	0.78±0.21 ^{bc}	0.96±0.28 ^{bc}	29.42±2.46 ^{bcd}	1.96±0.18 ^a	0.53±0.16 ^b
AS4	1.70±0.15 ^{efg}	1.61±0.02 ^{cde}	1.06±0.04 ^{bc}	2.87±0.09 ^{bc}	2.58±0.12 ^{bcd}	9.90±0.49 ^{bc}	0.78±0.03 ^{bc}	0.99±0.04 ^{bc}	28.79±1.46 ^{bcd}	1.34±0.04 ^b	0.55±0.02 ^b
AS5	1.17±0.20 ^h	1.23±0.19 ^e	0.83±0.12 ^{bc}	1.97±0.23 ^c	2.12±0.36 ^{cd}	8.51±1.53 ^d	0.69±0.08 ^{bc}	0.86±0.13 ^{bc}	13.53±1.16 ^{cd}	1.19±0.12 ^b	0.22±0.01 ^a
AS6	1.78±0.16 ^{def}	1.73±0.30 ^{cde}	1.08±0.18 ^{bc}	2.37±0.46 ^{bc}	2.79±0.51 ^{bcd}	10.84±1.96 ^{bc}	0.97±0.17 ^{bc}	1.14±0.19 ^b	12.80±1.27 ^{cd}	1.51±0.26 ^b	0.65±0.11 ^b
AS7	1.79±0.47 ^{def}	2.02±0.65 ^{bcd}	1.33±0.45 ^b	3.06±1.13 ^b	3.58±13.31 ^{bc}	12.50±2.61 ^b	1.13±0.41 ^{ab}	1.06±0.38 ^{bc}	37.29±1.36 ^b	1.76±0.64 ^b	0.53±0.18 ^b
AS8	1.83±0.09 ^{cde}	1.84±0.16 ^{bcde}	1.18±0.12 ^{bc}	2.59±0.37 ^{bc}	2.98±0.35 ^{bcd}	10.63±1.23 ^{bc}	0.91±0.10 ^{bc}	1.04±0.14 ^{bc}	31.34±3.81 ^{bc}	1.42±0.17 ^b	0.55±0.08 ^b
AS9	1.81±0.02 ^{cdef}	1.73±0.03 ^{bcde}	1.12±0.08 ^{bc}	2.26±0.03 ^{bc}	2.67±0.03 ^{bcd}	10.18±0.11 ^{bc}	0.72±0.05 ^{bc}	0.94±0.02 ^{bc}	28.79±1.02 ^{bcd}	1.30±0.03 ^b	0.50±0.03 ^b
AS10	2.35±0.09 ^{ab}	2.20±0.09 ^{bcd}	1.35±0.06 ^{bc}	3.06±0.05 ^b	3.66±0.05 ^b	11.45±0.08 ^b	1.08±0.08 ^{ab}	1.06±0.06 ^{bc}	32.06±0.06 ^{bc}	1.53±0.04 ^b	0.55±0.04 ^b
AS11	2.19±0.01 ^{bcd}	2.24±0.05 ^{bc}	1.37±0.05 ^b	3.05±0.04 ^b	3.64±0.05 ^{bc}	11.62±0.03 ^b	1.14±0.04 ^{ab}	1.14±0.04 ^b	31.53±0.06 ^{bc}	1.64±0.05 ^b	0.56±0.05 ^b
AS12	2.27±0.04 ^{abc}	1.98±0.04 ^{bcd}	1.14±0.04 ^{bc}	2.48±0.02 ^{bc}	2.93±0.04 ^{bcd}	9.89±0.01 ^{bc}	0.86±0.05 ^{bc}	1.03±0.05 ^{bc}	27.14±0.06 ^{bcd}	1.37±0.04 ^b	0.56±0.04 ^b
AS13	1.28±0.02 ^{gh}	1.17±0.05 ^e	0.66±0.05 ^c	1.43±0.03 ^c	1.65±0.03 ^d	5.51±0.08 ^{cd}	0.53±0.01 ^c	0.56±0.02 ^c	14.76±0.05 ^{cd}	0.84±0.05 ^b	0.35±0.01 ^b
AS14	1.35±0.05 ^{fgh}	1.56±0.08 ^{de}	0.97±0.04 ^{bc}	1.96±0.05 ^{bc}	2.36±0.06 ^{bcd}	7.59±0.09 ^{bc}	0.75±0.04 ^{bc}	0.74±0.04 ^{bc}	9.26±0.06 ^d	1.14±0.03 ^b	0.40±0.01 ^b

Results presented by the average of the triplicates followed ± standard deviation. The values in the same column, with equal letters, were not significant at the 5% level.

Table 4 – Profile of fatty acids (g.100 g⁻¹) in samples of national and imported salted butters.

Sample	C18:0	C18:1n9 (<i>cis</i> -9, 12)	C18:1n9 (<i>trans</i> -9, 12)	C18:2n6 (<i>cis</i> - 9, 12)	C18:2n6 (<i>trans</i> -9, 12)	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	C20:1n9	CLA
AS1	7.92±0.27 ^a	38.82±0.93 ^a	3.62±0.05 ^{abc}	4.60±0.90 ^a	0.10±0.01 ^a	0.17±0.03 ^a	0.70±0.01 ^a	0.35±0.04 ^a	0.96±0.06 ^a	0.67±0.04 ^{ab}
AS2	14.53±0.38 ^{ab}	26.08±5.59 ^b	3.62±0.98 ^{abc}	2.11±0.56 ^b	0.10±0.02 ^a	0.14±0.04 ^{ab}	0.39±0.09 ^b	0.29±0.08 ^a	0.49±0.24 ^{bc}	0.53±0.01 ^e
AS3	11.94±0.38 ^{bc}	22.04±3.86 ^{bc}	2.96±0.83 ^{bcd}	1.95±0.54 ^b	0.47±0.17 ^{bcd}	0.10±0.03 ^{abcde}	0.30±0.07 ^{bc}	0.18±0.04 ^b	0.53±0.12 ^{bc}	0.58±0.03 ^{cde}
AS4	11.84±0.59 ^{bc}	20.73±1.09 ^{bc}	2.91±0.15 ^{bcd}	0.97±0.06 ^b	0.27±0.00 ^{cd}	0.09±0.02 ^{bcd}	0.28±0.08 ^{bc}	0.16±0.01 ^{bc}	0.37±0.06 ^{bc}	0.52±0.01 ^e
AS5	7.83±0.91 ^{bc}	14.29±0.26 ^{bc}	2.75±0.26 ^{cd}	1.65±0.24 ^b	0.30±0.02 ^{cd}	0.11±0.00 ^{abcd}	0.24±0.01 ^{bc}	0.14±0.01 ^{bc}	0.36±0.00 ^{bc}	0.70±0.02 ^{ab}
AS6	11.89±0.21 ^{bc}	21.79±0.39 ^{bc}	2.85±0.55 ^{cd}	1.49±0.25 ^b	0.42±0.09 ^{bcd}	0.11±0.03 ^{abc}	0.30±0.05 ^{bc}	0.16±0.03 ^{bc}	0.39±0.04 ^{bc}	0.62±0.02 ^{bcd}
AS7	9.63±0.35 ^{bc}	19.71±0.73 ^{bc}	1.74±0.71 ^d	1.90±0.77 ^b	0.68±0.16 ^b	0.07±0.02 ^{cdef}	0.31±0.01 ^{bc}	0.13±0.04 ^{bc}	0.39±0.17 ^{bc}	0.69±0.01 ^{ab}
AS8	10.95±1.25 ^{bc}	20.51±0.23 ^{bc}	2.04±0.33 ^d	2.02±0.23 ^b	0.54±0.00 ^{bc}	0.08±0.01 ^{bcd}	0.24±0.02 ^{bc}	0.14±0.02 ^{bc}	0.66±0.21 ^{ab}	0.73±0.01 ^a
AS9	6.79±0.56 ^c	11.77±0.96 ^c	2.54±0.01 ^{cd}	0.97±0.07 ^b	0.37±0.00 ^{cd}	0.10±0.02 ^{abcde}	0.26±0.03 ^{bc}	0.17±0.01 ^b	0.32±0.05 ^c	0.66±0.04 ^{abc}
AS10	8.56±0.58 ^{bc}	17.47±0.06 ^{bc}	4.24±0.46 ^{ab}	1.64±0.05 ^b	0.29±0.01 ^{cd}	0.04±0.00 ^{ef}	0.25±0.04 ^{bc}	0.13±0.06 ^{bc}	0.62±0.09 ^{bc}	0.66±0.05 ^{abc}
AS11	9.14±0.49 ^{bc}	18.45±0.05 ^{bc}	4.46±0.13 ^a	1.63±0.05 ^b	0.34±0.05 ^{cd}	0.02±0.00 ^f	0.31±0.01 ^{bc}	0.13±0.01 ^{bc}	0.45±0.04 ^{bc}	0.54±0.04 ^{de}
AS12	8.78±0.51 ^{bc}	17.67±0.04 ^{bc}	4.47±0.07 ^a	1.76±0.05 ^b	0.35±0.02 ^{cd}	0.02±0.00 ^f	0.31±0.05 ^{bc}	0.12±0.01 ^{bc}	0.58±0.09 ^{bc}	0.65±0.03 ^{abc}
AS13	6.08±0.02 ^c	12.50±0.05 ^c	3.07±0.05 ^{abcd}	1.56±0.05 ^b	0.30±0.01 ^{cd}	0.02±0.01 ^f	0.27±0.01 ^{bc}	0.76±0.05 ^c	0.42±0.02 ^{bc}	0.51±0.01 ^e
AS14	5.64±0.07 ^c	11.96±0.10 ^c	2.66±0.46 ^{cd}	1.11±0.07 ^b	0.20±0.01 ^d	0.04±0.00 ^{def}	0.20±0.01 ^c	0.84±0.04 ^{bc}	0.36±0.05 ^{bc}	0.31±0.02 ^f

Results presented by the average of the triplicates followed ± standard deviation. The values in the same column, with equal letters, were not significant at the 5% level.

Table 5 – Profile of fatty acids (g.100 g⁻¹) in samples of national and imported unsalted butters.

Sample	C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C14:1	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0
A1	2.07±0.09 ^{bc}	2.58±0.28 ^{bc}	1.68±0.11 ^{cd}	4.23±0.22 ^{cd}	4.82±0.25 ^b	16.67±0.87 ^b	1.21±0.06 ^{cd}	1.56±0.01 ^{bcd}	43.92±2.18 ^{cd}	1.95±0.10 ^{cde}	0.72±0.05 ^{bcd}
A2	1.82±0.03 ^{cd}	1.77±0.08 ^{ef}	1.01±0.12 ^{fg}	2.79±0.01 ^{gh}	3.05±0.11 ^d	11.25±0.38 ^d	0.80±0.09 ^{fg}	1.03±0.01 ^{gh}	30.88±1.04 ^{fg}	1.46±0.03 ^{efgh}	0.53±0.01 ^{fgh}
A3	1.66±0.15 ^{de}	2.42±0.31 ^{bc}	1.75±0.16 ^{bc}	4.53±0.44 ^{bc}	5.36±0.33 ^a	10.27±1.65 ^e	1.30±0.16 ^{bcd}	1.50±0.24 ^{cde}	50.42±2.97 ^{bc}	2.27±0.21 ^{abcd}	0.76±0.12 ^{bcd}
A4	2.20±0.01 ^b	2.98±0.12 ^{ab}	2.10±0.01 ^{ab}	5.51±0.16 ^a	6.07±0.03 ^a	21.42±0.46 ^a	1.57±0.01 ^{ab}	1.98±0.03 ^a	62.14±2.40 ^a	2.73±0.46 ^a	0.97±0.01 ^a
A5	2.06±0.28 ^{bc}	2.70±0.34 ^{bc}	1.96±0.21 ^{ab}	5.04±0.43 ^{ab}	5.99±0.40 ^a	18.95±2.26 ^{ab}	1.56±0.13 ^{ab}	1.71±0.16 ^{abc}	57.82±3.43 ^{ab}	2.30±0.34 ^{abc}	0.86±0.08 ^{abc}
A6	2.23±0.14 ^b	2.65±0.16 ^{bc}	1.72±0.11 ^{cd}	4.35±0.24 ^{bcd}	4.90±0.20 ^b	17.01±0.50 ^{bc}	1.25±0.07 ^{cd}	1.55±0.10 ^{bcd}	45.30±1.41 ^{cd}	2.05±0.09 ^{cd}	0.81±0.05 ^{abcd}
A7	2.62±0.01 ^a	3.37±0.07 ^a	2.12±0.07 ^a	5.28±0.13 ^{ab}	6.20±0.29 ^a	21.07±0.98 ^a	1.65±0.13 ^a	1.90±0.10 ^{ab}	60.77±4.53 ^a	2.69±0.25 ^{ab}	0.90±0.02 ^{ab}
A8	2.32±0.05 ^{ab}	2.40±0.28 ^{bcd}	1.47±0.11 ^d	3.35±0.38 ^{efg}	3.90±0.42 ^{cd}	14.05±0.15 ^{cd}	1.00±0.09 ^{def}	1.34±0.13 ^{defg}	38.31±4.07 ^{def}	1.86±0.06 ^{cdef}	0.75±0.08 ^{bcd}
A9	1.82±0.08 ^{cd}	1.85±0.23 ^{def}	0.99±0.19 ^{fg}	2.22±0.49 ^h	2.61±0.60 ^{ef}	9.98±2.32 ^{ef}	0.82±0.18 ^{fg}	0.96±0.20 ^{hi}	29.03±6.14 ^{gh}	1.37±0.29 ^{fgh}	0.54±0.11 ^{efg}
A10	2.25±0.04 ^{ab}	2.32±0.01 ^{cde}	1.47±0.07 ^{de}	3.32±0.14 ^{efg}	3.74±0.19 ^d	14.61±0.79 ^{cd}	1.09±0.06 ^{cdef}	1.39±0.05 ^{cdef}	41.67±2.30 ^{cde}	1.90±0.10 ^{cde}	0.82±0.04 ^{abcd}
A11	2.19±0.26 ^{bc}	2.14±0.09 ^{cde}	1.31±0.04 ^{ef}	2.78±0.09 ^{gh}	3.15±0.13 ^{de}	11.98±0.41 ^{de}	0.87±0.04 ^{efg}	1.19±0.05 ^{efgh}	34.27±0.87 ^{efg}	1.51±0.06 ^{efg}	0.70±0.02 ^{cdef}
A12	2.04±0.01 ^{bc}	2.44±0.01 ^{bc}	1.57±0.06 ^{de}	3.93±0.18 ^{def}	4.74±0.20 ^{bc}	15.88±0.54 ^{bc}	1.34±0.04 ^{abc}	1.37±0.05 ^{cdefg}	46.49±1.30 ^{cd}	2.21±0.11 ^{bcd}	0.65±0.01 ^{defg}
A13	1.29±0.01 ^e	1.88±0.04 ^f	0.76±0.13 ^g	0.76±0.07 ⁱ	2.12±0.41 ^f	7.15±1.22 ^f	0.65±0.11 ^g	0.68±0.13 ⁱ	20.44±3.66 ^{hi}	1.02±0.17 ^{gh}	0.32±0.06 ⁱ
A14	2.00±0.07 ^{bcd}	1.81±0.25 ^{ef}	1.25±0.10 ^{ef}	3.11±0.15 ^{fgh}	3.64±0.16 ^d	11.97±0.53 ^{de}	1.13±0.05 ^{cde}	1.06±0.05 ^{fgh}	32.85±1.65 ^{efg}	1.78±0.10 ^{def}	0.49±0.02 ^{ghi}
A15	2.35±0.04 ^{ab}	2.53±0.06 ^{bc}	1.44±0.05 ^{de}	3.15±0.05 ^{fgh}	3.68±0.10 ^d	11.66±0.06 ^{de}	1.20±0.10 ^{cd}	1.16±0.05 ^{efgh}	15.64±0.05 ⁱ	0.97±0.05 ^h	0.34±0.04 ^{hi}

Results presented by the average of the triplicates followed ± standard deviation. The values in the same column, with equal letters, were not significant at the 5% level.

Table 6 – Profile of fatty acids (g.100 g⁻¹) in samples of national and imported unsalted butters.

Sample	C18:0	C18:1n9 (<i>cis</i> -9, 12)	C18:1n9 (<i>trans</i> -9, 12)	C18:2n6 (<i>cis</i> -9, 12)	C18:2n6 (<i>trans</i> -9, 12)	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	C20:1n9	CLA
A1	18.22±0.96 ^{abc}	31.10±1.66 ^{bc}	3.57±0.39 ^{abc}	3.04±0.17 ^{def}	0.65±0.31 ^{bcde}	0.13±0.02 ^b	0.63±0.05 ^b	0.24±0.01 ^{bc}	0.51±0.12 ^{bcd}	0.73±0.00 ^a
A2	15.77±0.40 ^c	21.17±0.04 ^e	2.76±0.00 ^{cde}	2.33±0.06 ^{fgh}	0.52±0.00 ^{cde}	0.09±0.00 ^b	0.35±0.01 ^b	0.17±0.00 ^{de}	0.40±0.10 ^{cde}	0.66±0.03 ^{abcd}
A3	20.01±1.34 ^{ab}	34.74±3.72 ^{ab}	4.38±0.35 ^a	3.82±0.27 ^{bcd}	0.94±0.14 ^{ab}	0.16±0.01 ^b	0.55±0.04 ^b	0.25±0.03 ^{bc}	0.65±0.14 ^{bcd}	0.64±0.04 ^{bcde}
A4	20.26±0.66 ^{ab}	38.71±0.50 ^b	3.64±0.15 ^{abc}	4.75±0.21 ^a	0.99±0.02 ^a	0.16±0.00 ^b	0.72±0.00 ^{ab}	0.33±0.01 ^a	0.93±0.12 ^b	0.68±0.03 ^{abc}
A5	18.03±2.04 ^{abc}	35.82±2.39 ^{ab}	3.41±0.43 ^{abcd}	4.14±0.31 ^{ab}	0.72±0.08 ^{abcd}	0.13±0.01 ^b	1.87±0.14 ^a	0.22±0.03 ^{cd}	0.59±0.04 ^{bcd}	0.59±0.00 ^{de}
A6	18.43±0.64 ^{abc}	32.80±0.80 ^b	4.17±0.22 ^a	3.23±0.12 ^{cde}	0.82±0.09 ^{abc}	0.13±0.00 ^b	0.64±0.05 ^b	0.29±0.05 ^{ab}	0.85±0.23 ^b	0.60±0.01 ^{cde}
A7	20.96±0.05 ^a	39.00±1.62 ^a	4.11±0.14 ^a	4.83±0.38 ^a	0.96±0.02 ^{ab}	0.15±0.00 ^b	0.53±0.01 ^b	0.25±0.00 ^{bc}	0.83±0.05 ^{bc}	0.59±0.00 ^{cde}
A8	17.45±1.90 ^{bc}	30.38±3.63 ^{bcd}	3.71±0.75 ^{abc}	3.93±0.62 ^{bc}	0.54±0.02 ^{cde}	0.13±0.03 ^b	0.74±0.09 ^{ab}	0.24±0.02 ^{bc}	2.49±0.40 ^a	0.59±0.00 ^{cde}
A9	10.87±2.21 ^d	19.59±4.62 ^e	2.87±0.62 ^{bcde}	1.46±0.36 ^{ij}	0.46±0.05 ^{de}	0.10±0.02 ^b	0.30±0.05 ^b	0.16±0.03 ^{de}	0.39±0.07 ^{de}	0.61±0.01 ^{bcde}
A10	18.30±1.03 ^{abc}	31.71±1.79 ^b	3.73±0.21 ^{abc}	2.52±0.09 ^{efg}	0.63±0.00 ^{bcde}	0.13±0.01 ^b	0.42±0.02 ^b	0.26±0.01 ^{bc}	0.59±0.04 ^{bcd}	0.69±0.01 ^{ab}
A11	15.77±0.55 ^c	24.79±0.74 ^{cde}	3.85±0.18 ^{ab}	1.98±0.08 ^{ghi}	0.56±0.06 ^{cde}	1.02±0.88 ^a	0.37±0.02 ^b	0.20±0.01 ^{cd}	0.06±0.00 ^e	0.69±0.06 ^{ab}
A12	11.65±0.28 ^d	23.94±0.68 ^{de}	2.20±0.02 ^e	2.36±0.07 ^{fgh}	0.71±0.07 ^{abcde}	0.10±0.01 ^b	0.42±0.01 ^b	0.16±0.01 ^{de}	0.52±0.03 ^{bcd}	0.67±0.04 ^{abcd}
A13	5.35±0.96 ^{ef}	11.64±1.75 ^f	1.13±0.16 ^f	11.82±1.94 ^j	0.38±0.09 ^e	0.04±0.01 ^b	0.20±0.02 ^b	0.09±0.00 ^f	0.87±0.13 ^b	0.57±0.04 ^e
A14	8.68±0.52 ^{de}	20.68±1.12 ^e	1.91±0.11 ^{ef}	2.07±0.05 ^{ghi}	0.43±0.18 ^{de}	0.07±0.00 ^b	0.37±0.00 ^b	0.13±0.00 ^{ef}	0.39±0.02 ^{de}	0.56±0.02 ^e
A15	4.68±0.10 ^f	18.56±0.05 ^e	2.41±0.43 ^{de}	1.59±0.09 ^{hij}	0.48±0.03 ^{de}	0.15±0.04 ^b	0.31±0.02 ^b	0.17±0.01 ^{de}	0.55±0.06 ^{bcd}	0.55±0.05 ^e

Results presented by the average of the triplicates followed ± standard deviation. The values in the same column, with equal letters, were not significant at the 5% level.

3.3 NOTA TÉCNICA 1

ANÁLISE SENSORIAL PARA O DESENVOLVIMENTO DE MANTEIGA ADICIONADA DE CÁPSULAS PROBIÓTICAS

SILVA^{1*}, Maritiele Naissinger da; RICHARDS², Neila Silvia Pereira dos Santos (...)

¹Doutoranda. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: maritielens@gmail.com

²Professora orientadora. Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: neilarichardsprof@gmail.com

*Autor para correspondência

RESUMO

A análise sensorial serve para testar a aceitação de um produto por parte dos consumidores, podendo ser um novo produto ou verificar se alterações realizadas são perceptíveis e aceitas pelos provadores. A adição de probióticos em diversos alimentos tem sido estudada, entre estes, em manteigas. Visando o desenvolvimento de uma manteiga adicionada de cápsulas contendo probióticos em seu interior, esse estudo avaliou a aceitação prévia da manteiga em relação a presença das partículas e o teor de cápsulas que deveriam ser adicionadas para que o produto apresentasse viabilidade probiótica. As concentrações de cápsulas adicionadas nas manteigas foram de 3%, 5% e 10%. O teor de 5 e 10% de cápsulas apresentaram os resultados mais satisfatórios para viabilidade probiótica, portanto os testes sensoriais de aceitação e

intenção de compra foram realizados com o maior teor, de 10%. A manteiga contendo as cápsulas foi bem aceita pelos provadores.

Palavras-chave: Teste de aceitação; Encapsulação; Teste de intenção de compra; Viabilidade.

A análise sensorial é definida pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1993) como a área científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações frente às características dos alimentos e materiais, bem como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição.

A análise sensorial pode ser realizada por uma equipe treinada, provadores em geral ou consumidores do produto a ser avaliado, visando analisar as características sensoriais de um produto para um determinado fim. Pode-se avaliar a seleção da matéria prima a ser utilizada em um novo produto, o efeito do processamento, a qualidade da textura, o sabor, a estabilidade de armazenamento, a reação do consumidor, entre outros. Para alcançar o objetivo específico de cada análise, são elaborados métodos de avaliação diferenciados, visando a obtenção de respostas mais adequadas ao perfil pesquisado do produto. Esses métodos apresentam características que se moldam com o objetivo da análise (TEIXEIRA, 2009).

Para iniciar o desenvolvimento de um novo produto, sendo este uma manteiga contendo bactérias probióticas encapsuladas, buscou-se realizar testes prévios para, primeiramente avaliar a aceitação da manteiga quanto a presença das partículas, as quais são visíveis no alimento. Concomitantemente, foi avaliado o teor de cápsulas necessárias a serem adicionadas na manteiga para que a mesma apresentasse concentração suficiente para ser considerada probiótica durante o período de armazenamento.

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos, que quando administrados em quantidade adequada conferem benefícios para a saúde ao hospedeiro (FAO, 2002), através da regulação da imunidade local e sistêmica e pela melhora do balanço nutricional e microbiano no trato intestinal (MENEZES et al., 2013). Um alimento comercial com alegações de trazer benefícios à saúde devido à adição de probióticos deve conter um número de células viáveis de culturas probióticas de, pelo menos, 10^6 a 10^7 log UFC g⁻¹ (FAO, 2008).

Pela dificuldade e pelo fato de vários fatores interferirem na viabilidade dos probióticos, um dos maiores desafios da indústria de alimentos é manter os microrganismos viáveis durante o período de vida de prateleira dos produtos, ou próximo disso (GRANATO et al., 2010). A encapsulação tem sido estudada para proteger os microrganismos e poder oferecer a viabilidade probiótica a novos produtos por um tempo de armazenamento mais longo (OZER et al., 2009; HEIDEBACH; FORST; KULOZIK, 2012; MARTÍN; LARA-VILLOSLADA; RUIZ; MORALES, 2015).

Encapsulação pode ser definida como uma tecnologia de empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas que são capazes de liberar seu conteúdo em determinado momento sob influência de condições específicas (ZUIDAM; SHIMONI, 2010; MARTÍN; LARA-VILLOSLADA; RUIZ; MORALES, 2015). A técnica de encapsulação já é amplamente utilizada nas áreas alimentícia, têxtil, agroquímica e farmacêutica (CAVALHEIRO et al., 2015).

O objetivo deste estudo foi avaliar o teor de cápsulas considerado adequado para adicionar na manteiga matriz e obter um alimento probiótico, além de verificar se o produto adicionado de cápsulas é aceito pelos consumidores. Para tanto, foram utilizados testes sensoriais de aceitação e intenção de compra.

As manteigas foram desenvolvidas a partir da gordura do leite de vacas da raça Jersey. A nata foi padronizada a 35% de gordura com adição de leite desnatado e submetida a

pasteurização a 65 °C por 30 minutos, sendo, posteriormente, resfriada para 10 °C. Após, foi realizada a inversão da nata através da bateção e posterior malaxagem. Na etapa da malaxagem foram adicionadas as cápsulas contendo as bactérias probióticas. A manteiga probiótica foi embalada em potes plásticos e conservada sob refrigeração em temperatura máxima de 5 °C durante o período de análises.

Para os testes do teor ideal de cápsulas probióticas a serem adicionadas, foram produzidas cinco formulações de manteiga a partir da manteiga-base: uma formulação padrão (sem adição de cápsulas com probióticos), uma formulação contendo a adição de microrganismos livres (sem estarem encapsulados) e três formulações com quantidades variáveis de cápsulas probióticas, com 3%, 5% e 10%. Visto que o melhor resultado obtido nos testes de viabilidade probiótica na manteiga (teor de 3%, 5% ou 10% de cápsulas) seria utilizado para realização da análise sensorial, bem como o teor máximo possível à ser adicionado nas manteigas, para verificar se a presença das mesmas seria aceita pelos provadores.

A encapsulação dos microrganismos foi realizada a partir da técnica de extrusão e seguidas as recomendações propostas por KRASAEKOOPT, BHANDARI, DEETH (2004), ETCHEPARE (2014) e CAVALHEIRO (2016), com adaptações. A matriz encapsulante utilizada na elaboração das cápsulas foi o alginato de sódio de baixa viscosidade na concentração de 1,0% m/v, da marca Dinâmica®, gotejado no material de cobertura (cloreto de cálcio dihidratado 0,1 mol L⁻¹ da marca Synth®). As culturas probióticas liofilizadas utilizadas, individualmente, foram *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*, das marcas Danisco® (gentilmente doado pela empresa Fermentech) e Infinity Pharma®, respectivamente, mantidas à - 18 °C.

Para o preparo do inóculo, a cultura probiótica (1 g) foi ativada em caldo MRS (Sigma-Aldrich®) (100 mL) e incubada durante 15 horas a 37 °C. Após, foi centrifugada a

4670 x g por 15 minutos em centrífuga refrigerada (Hitachi CR22GIII) e lavada com solução de NaCl (0,85% m/v) por duas vezes. Após o procedimento de ativação do microrganismo, foi adicionado 1,0% da cultura ativada na solução de alginato de sódio previamente preparada (esterilizada em autoclave e resfriada), e imediatamente foi iniciada a encapsulação de cada microrganismo.

A contagem de células probióticas viáveis foi realizada com o intuito de conhecer a concentração de células viáveis nas manteigas durante a vida de prateleira. Para proceder a análise, foram transferidas alíquotas de 1,0 mL em diluições adequadas, em triplicata, para placas de petri esterilizadas descartáveis. Para *Lactobacillus acidophilus* realizou-se plaqueamento por profundidade em ágar MRS (Kasvi[®]), e para determinar a concentração de *Bifidobacterium bifidum* foi adicionado 0,5% de solução A (dicloxacilina na concentração de 0,01% m/v), 1,0% de solução B (cloreto de lítio a 11,0% m/v) e 0,5% de solução C (cloreto de cisteína a 10,0% m/v) em ágar MRS (Kasvi[®]) e realizado plaqueamento por profundidade. Após a inoculação, as placas foram incubadas invertidas em jarra de anaerobiose, em estufa bacteriológica a 37 °C por 72 horas.

As cápsulas contendo microrganismos foram testadas por um período de 45 dias de armazenamento, sob refrigeração, em temperatura máxima de 5 °C. A análise de viabilidade do probiótico durante a vida de prateleira foi realizada no dia zero (dia de fabricação) e a cada sete dias. Para verificar o teor de cápsulas que deveriam ser adicionadas na manteiga, foram realizados testes com 3%, 5% e 10% de cápsulas de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* (Tabela 1).

Sendo assim, após conhecer o teor de cápsulas considerado ideal para adição nas manteigas, foram preparadas duas formulações a partir da manteiga-base: uma formulação padrão (sem adição de probióticos) e uma formulação contendo 10% de cápsulas, para a análise sensorial.

As manteigas e as cápsulas foram produzidas 24 horas antes da realização da análise sensorial. Esta foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Alimentos e Nutrição da Universidade Federal de Santa Maria *campus* Palmeira das Missões. Os provadores assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), concordando em participar da pesquisa. O estudo está registrado e aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria, sob número de registro CAAE 56769116.9.0000.5346.

As manteigas padrão e com 10% de cápsulas foram submetidas aos testes afetivo de aceitação e de intenção de compra. As amostras foram oferecidas aos provadores para avaliação em relação aos atributos de cor, aroma, sabor, textura e aparência global, utilizando escala hedônica estruturada verbal, bipolar de sete pontos (1 = desgostei muitíssimo, 2 = desgostei muito, 3 = desgostei, 4 = indiferente, 5 = gostei, 6 = gostei muito e 7 = gostei muitíssimo) conforme LAWLESS e HEYMANN (2010). Para intenção de compra foi utilizada uma escala de cinco pontos (1 = certamente não compraria, 2 = provavelmente não compraria, 3 = talvez sim/ talvez não, 4 = provavelmente compraria e 5 = certamente compraria). As amostras foram servidas em temperatura adequada de 10 °C e mantendo-se a mesma temperatura durante a análise, juntamente com água e biscoito água e sal, e codificadas com algarismos de três dígitos aleatórios (IAL, 2008).

A análise sensorial teve por objetivo avaliar a aceitação da manteiga contendo cápsulas de alginato de sódio e cloreto de cálcio, por parte dos consumidores, os quais não receberam a informação sobre as cápsulas poderem conter microrganismos probióticos. Participaram da análise 180 provadores não treinados, incluindo estudantes, professores, técnicos administrativos e funcionários terceirizados, todos consumidores de manteiga (Tabela 2).

De acordo com os resultados da Tabela 1, o microrganismo *L. acidophilus* destaca-se por ser viável por um período de 45 dias de armazenamento e apresenta uma contagem superior a $8 \log \text{ UFC g}^{-1}$, enquanto que o *B. bifidum* apresenta viabilidade até 22 dias de armazenamento, porém é uma contagem insatisfatória ($2 \log \text{ UFC g}^{-1}$), pois para conferir os benefícios probióticos precisa possuir o mínimo de $6 \log \text{ UFC g}^{-1}$. O *L. acidophilus* se torna mais resistente quando encapsulado em partículas de alginato, enquanto o *Bifidobacterium* sp. são mais sensíveis, sendo necessários revestimentos na cápsula para sua sobrevivência por maior tempo, além disso, também são menos resistentes aos ácidos gástricos e condições de armazenamento (SHORI, 2017).

O microrganismo livre não apresenta viabilidade probiótica no armazenamento e a adição de 3% de cápsulas foi insuficiente para obter a manteiga probiótica. Desta forma, a partir destes resultados, sugere-se a produção de manteigas com adições de 5% e 10% de cápsulas probióticas.

Os resultados (Tabela 3) referentes a avaliação da aceitação quanto aos atributos cor, aroma, sabor, textura e aparência global foram satisfatórios, demonstrando que a manteiga contendo cápsulas foi bem aceita pelos provadores. A cor, textura e aparência global não apresentaram diferenças estatísticas entre as duas amostras (manteiga padrão – sem adições e manteiga contendo 10% de cápsulas), entendendo-se que as cápsulas não interferiram na aparência da manteiga. O sabor e aroma apresentaram diferenças significativas, podendo-se atribuir essa diferença a ideia de que eram produtos diferentes, visto que a manteiga-base era idêntica entre as amostras e a adição das cápsulas não confere sabor e odor à manteiga. A escala hedônica, para todos os atributos encontrou-se na faixa entre 5 e 6, que se remete a aceitação “gostei” e “gostei muito”.

Quanto a intenção de compra (Tabela 4), dos 180 provadores, 28,9% (n=52) certamente comprariam e 52,2% (n=94) provavelmente comprariam, enquanto apenas sete

provadores (3,9%) provavelmente ou certamente não comprariam. Ainda há 15,0% (n=27) que talvez sim/ talvez não comprariam. Mesmo assim, pode-se considerar que a manteiga adicionada de cápsulas possui consumidores dispostos a comprá-la, ressaltando ainda, que a intenção de compra foi maior do que a manteiga sem cápsulas, que obteve um total de 22,2% (n=40) de provadores que certamente comprariam.

Conclui-se que a manteiga para possuir a concentração ideal de microrganismos probióticos e apresentar viabilidade por um maior período de armazenamento, deve ser adicionada de 5% a 10% de cápsulas probióticas. Quanto a análise sensorial, a manteiga contendo 10% de cápsulas pode ser considerada para comercialização por parte dos consumidores, visto que poderia aumentar a sua aceitação quando os consumidores buscam em adquirir alimentos funcionais.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **Análise sensorial dos alimentos e bebidas**: terminologia. 1993. 8 p.

CAVALHEIRO, C. P. et al. Encapsulação: alternativa para a aplicação de microrganismos probióticos em alimentos termicamente processados. **Ciência e Natura**, Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, v. 37, p. 65 – 74, 2015.

CAVALHEIRO, C. P. **Probióticos encapsulados aplicados em produtos cárneos**. 151p. Tese (Doutorado) do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

ETCHEPARE, M. A. **Produção, caracterização e viabilidade de micropartículas com *Lactobacillus acidophilus* obtidas por gelificação iônica**. 2014. 120 p. Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Diretrizes para a avaliação de probióticos em alimentos**. London, Ontario, Canada. April 30 and May 1. 2002.

GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; SHAH, N. P. Probiotic dairy products as functional foods. **Food Science and Technology**, v. 9, n. 5, p. 455-470, 2010.

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

IAL. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 1020.

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

International Dairy Journal, v. 14, n. 8, p. 737-743. 2004.

LAWLESS, H.; HEYMANN, H. **Sensory Evaluation of Food Science Principles and Practices**. Chapter 1, 2nd Edition, Ithaca, New York, 2010.

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

MENEZES, C. R. et al. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, v. 43, n.7, p.1309-1316, 2013.

OZER, B.; KIRMACHI, A.; SENEL E, ATAMER M, HAYALOGLU A. Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* La-5 in white-brined cheese by microencapsulation. **International Dairy Journal**., v. 19, n. 1, p. 22-29, 2009.

SHORI, A. B. Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit. **Journal of Biosciences**, v.24, n.1, p. 1-5, 2017.

TEIXEIRA, L. V. Análise sensorial na indústria de alimentos. **Revista Instituto Laticínio “Cândido Tostes”**, Jan/Fev, nº 366, 64: 12-21, 2009.

ZUIDAM, N. J.; SHIMONI, E. **Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing**. Springer, New York, U. S. A., 2010.

Tabela 1 – Resultado da manteiga adicionada de probiótico: livre e encapsulado (com adição de 3%, 5% e 10% de cápsulas) durante período de 45 dias de armazenamento sob temperatura de 5 °C. Resultados expressos em log UFC g⁻¹.

Amostra de manteiga	Dias de armazenamento (5 °C)					
	0	15	22	30	37	45
<i>L. acidophilus</i>						
Padrão	1,30	N.D.	-	-	-	-
Livre (1%)	6,57	2,71	N.D.	-	-	-
3% cápsulas	7,57	6,63	6,32	4,78	2,86	0,00
5% cápsulas	9,95	9,79	8,69	8,77	8,52	8,04
10% cápsulas	11,36	10,89	10,25	9,60	8,82	8,59
<i>B. bifidum</i>						
Padrão	1,30	-	-	-	-	-
Livre (1%)	4,34	-	-	-	-	-
3% cápsulas	4,04	2,54	-	-	-	-
5% cápsulas	5,69	2,55	-	-	-	-
10% cápsulas	5,86	2,83	2,08	-	-	-

Médias obtidas das três repetições da experimentação, todas realizadas em triplicatas.

N.D. = não detectado.

Fonte: Autora.

Tabela 2 – Informações de gênero e faixa etária dos 180 provadores da análise sensorial das duas amostras de manteiga (manteiga padrão e manteiga com 10% de cápsulas). Resultados expressos em frequência (%).

Gênero	Feminino		Masculino	
		79,44% (n=143)		20,56% (n=37)
Faixa etária	18 a 25 anos	26 a 35 anos	36 a 45 anos	>45 anos
	72,78% (n=131)	14,44% (n=26)	10,00% (n=18)	2,78% (n=5)

Legenda: n = número de provadores. N = 180.

Fonte: Autora.

Tabela 3 – Resultado da análise sensorial quanto ao teste de aceitação das duas amostras de manteigas (manteiga padrão e manteiga com 10% de cápsulas). Resultados expressos são a média encontrada entre os 180 provadores para cada atributo.

	Cor	Aroma	Sabor	Textura	Aparência global
Sem cápsulas	5,89 ^a	5,52 ^b	5,76 ^b	5,62 ^a	5,74 ^a
Com cápsulas	5,94 ^a	5,77 ^a	6,02 ^a	5,61 ^a	5,68 ^a
C.V. (%)	5,62	7,82	7,21	8,92	8,02

Escala hedônica de 7 pontos: 7 = gostei muitíssimo; 6 = gostei muito; 5 = gostei; 4 = indiferente; 3 = desgostei; 2 = desgostei muito; 1 = desgostei muitíssimo.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. N = 180

Fonte: Autora.

Tabela 4 – Resultado da análise sensorial quanto ao teste de intenção de compra das duas amostras de manteigas (manteiga padrão e manteiga com 10% de cápsulas). Resultados expressos em frequência (%).

	Certamente não compraria	Provavelmente não compraria	Talvez sim/ Talvez não	Provavelmente compraria	Certamente compraria
Sem cápsulas	0,0% (n=0)	4,4% (n=8)	21,1% (n=38)	52,2% (n=94)	22,2% (n=40)
Com cápsulas	1,1% (n=2)	2,8% (n=5)	15,0% (n=27)	52,2% (n=94)	28,9% (n=52)

Legenda: n = número de provadores. N = 180.

Fonte: Autora.

3.4 MANUSCRITO 2

ENCAPSULAÇÃO DE *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium bifidum* POR EXTRUSÃO, AVALIAÇÃO *IN VITRO* E CARACTERIZAÇÃO DAS CÁPSULAS PROBIÓTICAS

SILVA^{1*}, Maritiele Naissinger da; RICHARDS², Neila Silvia Pereira dos Santos (...)

¹Doutoranda. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: maritielens@gmail.com

²Professora orientadora. Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: neilarichardsprof@gmail.com

*Autor para correspondência

RESUMO

Tecnologias que possam proteger os microrganismos das condições adversas no processamento, armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal têm sido estudadas. O objetivo deste estudo foi encapsular bactérias probióticas, avaliar a sua viabilidade durante a vida de prateleira, a simulação gastrointestinal (teste *in vitro*) e durante o comportamento térmico, além de caracterizar as esferas obtidas por meio de análises físico-químicas e morfológicas. A encapsulação foi realizada através da técnica de extrusão, com solução de alginato de sódio 1% m/v e solução de cloreto de cálcio 0,1 mol L⁻¹. Os testes *in vitro* foram realizados no dia de fabricação das cápsulas probióticas, a vida de prateleira foi realizada a cada quinze dias de armazenamento, partindo do tempo zero até completar 60 dias, por meio de contagem bacteriana de células de *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. em meio MRS ágar, e as demais análises físico-químicas foram realizadas após 24 horas da produção e a morfologia após liofilização das cápsulas. As cápsulas foram armazenadas em refrigeração a 5 °C. Os testes mostraram que as cápsulas produzidas com *Lactobacillus acidophilus* apresentaram maior viabilidade probiótica, e a vida de prateleira encerrou com 45 dias de armazenamento, pois no dia 60 apresentaram crescimento de bolores.

Palavras-chave: Viabilidade de microrganismos; comportamento térmico; geleificação iônica.

1 INTRODUÇÃO

A população mundial aumentará, dos atuais 7,6 bilhões de pessoas, para 9,8 bilhões até 2050, conforme estimativa da Organização das Nações Unidas (ONU), o que resultará no consequente aumento pela demanda por alimentos (Organização das Nações Unidas, 2018). Atrelado a essa maior quantidade de alimentos necessários, há um aumento constante no interesse dos consumidores por uma alimentação equilibrada e que ofereça benefícios a saúde, favorecendo o bem-estar físico e que auxilie na prevenção de doenças. Para atender essa demanda, a indústria de alimentos busca por inovações e aplicações de tecnologias, visando o desenvolvimento de alimentos funcionais, associado com a preocupação em manter as características organolépticas dos produtos (Rodríguez et al., 2016).

O desenvolvimento e o consumo de alimentos probióticos aumentou substancialmente devido ao reconhecimento dos seus efeitos benéficos na promoção da saúde. Probióticos são definidos como microrganismos vivos, que administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios a saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Diversos gêneros de microrganismos são utilizados como probióticos. Os gêneros *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. são exemplos, sendo que o *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *B. bifidum*, *B. animalis*, são espécies que se destacam na aplicação em alimentos devido ao seu potencial probiótico (Almeida et al., 2018; Simeoni et al., 2014). Os probióticos podem ser aplicados em diversos alimentos, sendo comumente são encontrados estudos com a aplicação em chocolates, sucos, sorvetes, queijos, iogurtes e lácteos em geral, e até mesmo em produtos cárneos, entre outros (De Prisco; Mauriello, 2016).

A utilização de probióticos em alimentos é limitada devido à dificuldade em mantê-los viáveis durante o processo de fabricação e a vida de prateleira do produto (Boscariolli, 2010). Os probióticos devem sobreviver aos ácidos gástricos para alcançar o intestino delgado e colonizar o hospedeiro, para assim promover a prevenção adequada e o controle de várias doenças gastrointestinais. Para melhorar as taxas de sobrevivência de microrganismos probióticos durante o transito gastrointestinal, a encapsulação é considerada um processo promissor (Shori, 2017).

Estudos sugerem que para aumentar a estabilidade dos compostos bioativos eles podem ser encapsulados em diferentes matrizes poliméricas (Ota et al., 2018; Arriola et al., 2019), o que também pode ser aplicado para microrganismos probióticos, possibilitando a chegada ao intestino na concentração necessária para exercer seu efeito benéfico (Kailasapathy, 2009).

A técnica de gelificação iônica, através de gotejamento por extrusão, representa uma técnica de encapsulação simples, eficiente e de baixo custo, que não requer equipamento especializado, altas temperaturas ou solventes orgânicos, tornando-a adequada para compostos hidrofóbicos ou hidrofílicos (Dordević et al., 2015). Diversos polímeros são utilizados frequentemente na encapsulação de probióticos, como o alginato (Mandal et al., 2006; Ota et al., 2018). O agente encapsulante forma uma cápsula que se desfaz através de estímulo específico, liberando as substâncias ativas no local ideal (Sohail et al., 2011).

De forma a colaborar com estudos existentes que avaliaram as propriedades da encapsulação e a viabilidade de microrganismos probióticos durante o armazenamento, este trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho, por meio de testes *in vitro* e vida de prateleira, de microrganismos probióticos encapsulados em alginato de sódio pela técnica de extrusão e caracterizar as esferas obtidas.

2 METODOLOGIA

2.1 Elaboração das cápsulas probióticas

Para a encapsulação dos microrganismos foi utilizada a técnica de extrusão e seguidas as recomendações propostas por Krasaekoopt, Bhandari, Deeth (2004), Etchepare (2014) e Cavalheiro (2016), com adaptações referentes ao equipamento utilizado para a formação das cápsulas.

A matriz encapsulante utilizada na elaboração das cápsulas foi o alginato de sódio de baixa viscosidade na concentração de 1,0% m/v, da marca Dinâmica®, gotejado no material de cobertura (cloreto de cálcio dihidratado 0,1 mol L⁻¹ da marca Synth®) (Figura 1) e mantido sob agitação por 30 minutos após o final da encapsulação. As culturas probióticas liofilizadas utilizadas foram *Lactobacillus acidophilus* LA-14, *Lactobacillus rhamnosus* LR-32 e *Bifidobacterium bifidum* BB-12, das marcas Danisco® (gentilmente doado pela empresa Fermentech), Probiotal® (gentilmente doado pela empresa Coana), e Infinity Pharma®, respectivamente, mantidas à - 18 °C. Todas as culturas foram encapsuladas individualmente.

Para o preparo do inóculo, a cultura probiótica (1 g) foi ativada em caldo MRS (Sigma-Aldrich®) (100 mL) e incubada durante 15 horas a 37 °C. Após, foi centrifugada a 4670 x g por 15 minutos em centrífuga refrigerada (Hitachi CR22GIII) e lavada em solução de NaCl (0,85% m/v) por duas vezes. Após o procedimento de ativação do microrganismo, foi adicionado 1,0% da cultura ativada na solução de alginato de sódio previamente preparada

(esterilizada em autoclave e resfriada), e imediatamente foi iniciada a encapsulação de cada microrganismo.

Além das cápsulas úmidas, foram testadas cápsulas secas. Para o desenvolvimento das cápsulas secas, seguiu-se o mesmo protocolo de produção das cápsulas úmidas, porém, após a fabricação estas foram congeladas a -18 °C por 24 horas e posteriormente secas em liofilizador. A liofilização foi realizada em Liofilizador LS 3000 Terroni, onde as cápsulas congeladas (- 18 °C) foram dispostas nas bandejas do equipamento e submetidas ao processo de secagem por oito horas diárias, durante seis dias, totalizando 48 horas de processo de secagem (vácuo: 13 a 24 mmHg e temperatura do condensador de - 52 °C). Após a secagem, as cápsulas foram guardadas em recipiente esterilizado em temperatura refrigerada a 5 °C, igualmente as cápsulas úmidas. A secagem foi realizada apenas com cápsulas contendo *Lactobacillus acidophilus* por ser o microrganismo que apresentou resultados mais satisfatórios para os testes de viabilidade.

2.2 Contagem das células probióticas viáveis

A contagem de células probióticas viáveis foi realizada após a ativação do microrganismo, com o intuito de conhecer a concentração de células viáveis na solução encapsulante e a concentração presente nas cápsulas formadas. Para proceder a análise, foram transferidas alíquotas de 1,0 mL em diluições, em triplicata, para placas de Petri descartáveis. Para *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhamnosus* realizou-se plaqueamento por profundidade em ágar MRS (Kasvi®), e para determinar a concentração de *Bifidobacterium bifidum* foi adicionado 0,5% de solução A (dicloxacilina na concentração de 0,01% m/v), 1,0% de solução B (cloreto de lítio a 11,0% m/v) e 0,5% de solução C (cloreto de cisteína a 10,0% m/v) em ágar MRS (Kasvi®) e realizado plaqueamento por profundidade. Após a inoculação, as placas foram incubadas invertidas em jarra de anaerobiose, em estufa bacteriológica a 37 °C por 72 horas.

2.3 Eficiência de encapsulação (EE)

A eficiência de encapsulação (EE), que avalia a taxa de sobrevivência dos microrganismos ao processo de encapsulação (Equação 1) foi calculada conforme Martín, Lara-Villoslada, Ruiz e Morales (2013), para as cápsulas.

$$EE = (N/ N_0) \times 100 \quad (1)$$

Onde N é o número de células viáveis ($\log \text{UFC g}^{-1}$) liberadas a partir das cápsulas e N_0 é o número de células viáveis ($\log \text{UFC g}^{-1}$) no concentrado de células antes da encapsulação.

2.4 Viabilidade e qualidade durante o período de armazenamento

As cápsulas contendo microrganismos foram armazenadas por um período de 60 dias, sob refrigeração, em temperatura máxima de 5 °C. A análise de viabilidade do probiótico durante a vida de prateleira foi realizada no dia zero (dia de fabricação) e a cada 15 dias, até o final do período de armazenamento, para todos os tratamentos, seguindo a técnica descrita anteriormente para contagem de células viáveis.

Foram realizadas análises para atestar a ausência de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, *Salmonella* sp., coliformes termotolerantes e análise de bolores e leveduras durante o período de armazenamento para determinar a vida de prateleira das cápsulas probióticas (Brasil, 2003). As análises foram realizadas no dia zero (dia de fabricação) e, a cada 15 dias, até completar 60 dias de armazenamento.

2.5 Teste de resistência *in vitro* às condições gastrointestinais

A viabilidade das cápsulas frente às condições gastrointestinais foi avaliada conforme descrito por Madureira et al. (2011). A viabilidade foi avaliada sequencialmente em meios que simulam as diferentes seções do trato gastrointestinal (esôfago/estômago, duodeno e íleo). Foram utilizadas alíquotas de 1 g de cápsulas úmidas adicionadas de 9 mL de água peptonada, sendo preparadas igualmente em três erlenmeyers e todos submetidos às mesmas condições para simulação gastrointestinal.

Previamente foram preparadas e esterilizadas em autoclave uma solução ácida (HCl 0,1 mol L⁻¹) e uma solução básica (NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹) para ajuste do pH das amostras ao longo da simulação gastrointestinal. Inicialmente, o pH foi ajustado a 6,9, para simular a acidez da boca, permanecendo por dois minutos nessa condição e partindo para próxima etapa.

Na etapa esôfago-estômago utilizou-se 25 mg mL⁻¹ de pepsina (Sigma®), preparada em HCl 0,1 mol L⁻¹. Esta solução foi adicionada, em alíquotas iguais, durante toda a fase gástrica, a uma quantidade de 0,05 mL mL⁻¹, seguindo as seguintes etapas de pH/tempo (minutos): 5,5/10 minutos, 4,6/10 minutos, 3,8/10 minutos, 2,8/20 minutos, 2,3/20 minutos e 2,0/20 minutos em uma rotação de 130 rpm, adicionando a pepsina (0,05 mL mL⁻¹) e sendo o pH

ajustado utilizando HCl 0,1 mol L⁻¹ em cada etapa. Ao final desta fase, era retirado um dos erlenmeyers e submetido imediatamente as análises de contagem de células probióticas viáveis correspondentes ao estômago.

Na etapa referente ao duodeno utilizou-se, a uma concentração de 0,25 mL mL⁻¹, uma solução contendo 2 g L⁻¹ de pancreatina (Sigma®) e 12 g L⁻¹ de sais biliares bovinos (Sigma®), preparada em NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹, sendo o pH ajustado para 5,0 com a adição da solução de enzimas pancreatina e bile (0,25 mL mL⁻¹) e permanecendo por 20 minutos a 45 rpm, ao final, era retirada o segundo erlenmeyer que correspondia a etapa do duodeno e também submetido imediatamente as análises de contagem de células probióticas viáveis.

A etapa referente ao íleo foi realizada por um aumento do pH para 6,5, utilizando uma solução de NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹, permanecendo por 90 minutos em rotação de 45 rpm, e ao final era submetido as análises para contagem de células probióticas viáveis.

Todas as soluções foram preparadas imediatamente no momento da utilização e esterilizadas com membrana de poro 0,22 µm (Minisart, Sartorius Stedim Biotech, Alemanha). As enzimas eram armazenadas em temperaturas de - 18 °C.

A análise foi conduzida em uma incubadora refrigerada tipo Shaker (TE-421, Tecnal, Brasil) mantida a 37 °C, com o intuito de simular a temperatura do corpo humano e a agitação mecânica foi utilizada em paralelo para simular os movimentos peristálticos intestinais, com intensidades semelhantes às alcançadas na seção do trato digestivo. Ao final de cada etapa, foram retiradas alíquotas para a contagem das células probióticas viáveis, conforme descrito anteriormente.

2.6 Comportamento térmico

Para conhecer o comportamento térmico dos microrganismos, de maneira livre e encapsulados, o *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium bifidum*, foram mantidos em três condições de temperatura: (1) temperatura ambiente de 25±5 °C, (2) temperatura de congelamento de - 18±2 °C e (3) submetidos a temperaturas de 50, 75 e 100 °C e analisadas as células viáveis até apresentarem contagem insatisfatória (inferior a 5 log UFC g⁻¹).

Para avaliar a viabilidade de 25±5 °C, e - 18±2 °C, os microrganismos ativados e as cápsulas contendo os microrganismos foram mantidos à essas temperaturas de armazenamento. A análise em temperatura ambiente foi realizada no tempo zero e a cada sete dias, e no armazenamento em congelamento a análise ocorreu a cada 30 dias.

Para a análise da viabilidade probiótica em temperaturas de aquecimento, a análise foi realizada a partir de 1 g dos microrganismos ativados e 1 g das cápsulas com cada microrganismo, adicionadas em tubos contendo 10 mL de água destilada. Os tubos foram submetidos a banho-maria por 15 minutos nas temperaturas de 50, 75 e 100 °C, conforme proposto por Sabikhi et al. (2010). Para determinação das células probióticas viáveis, durante e após o teste de temperatura, foi seguido procedimento citado anteriormente.

2.7 Caracterização físico-química

As análises físico-químicas (umidade, cinzas, proteína, gordura, carboidratos) foram realizadas seguindo as determinações propostas pela *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC) (2005), em metodologias descritas no capítulo “misturas”, página 929, volume II. Também foram avaliados pH, em potenciômetro, e atividade de água em AquaLab Series 4TE a 25 °C.

2.8 Avaliação do diâmetro e morfologia

O tamanho da partícula probiótica úmida foi determinada por meio do equipamento Mastersizer[®] 3000E (Malvern Instruments, Reino Unido).

A microscopia ótica das partículas úmidas foi realizada utilizando um microscópio modelo (Carl Zeiss Axio Scope. A1, Oberkochen, Germany) equipado com uma câmera digital Axio Cam MRc (Carl Zeiss). A morfologia das partículas secas foi caracterizada usando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Tescan, VEGA-3G, República Tcheca), acoplado com um detector de elétrons secundários (SE) para obtenção das imagens. Para esta análise as amostras foram recobertas com ouro (processo de metalização via *sputtering*, usando uma corrente de 20 mA por 90 segundos) (Chen et al., 2017).

2.9 Análise estatística

Os dados obtidos em planilhas do Microsoft Office Excel[®], foram analisados conforme delineamento inteiramente casualizado, aplicando análise descritiva, análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias, em um

nível de significância de 5% ($p < 0,05$). O programa estatístico utilizado foi o SPSS® versão 15.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi avaliada a viabilidade do *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium bifidum* liofilizados livres, sem serem submetidos ao processo de ativação, e não houve crescimento de colônias. Dessa forma, trabalhou-se com os microrganismos de maneira livre submetidos, anteriormente, sempre ao processo de ativação.

3.1 Eficiência da encapsulação (EE)

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1, e mostram que a encapsulação protegeu os microrganismos. A eficiência de encapsulação encontrada na literatura é bastante variada devido a diversidade dos microrganismos estudados e as técnicas de encapsulação aplicadas. Estudos sobre encapsulação relatam que a principal vantagem em produzir cápsulas maiores é a elevada eficiência de encapsulação que se obtém (Chen et al., 2017). Geralmente, a eficiência de encapsulação ao utilizar essa técnica é próxima de 100% (Urbanska et al., 2007; Holkem et al., 2016), sendo que para *L. acidophilus* e *B. bifidum* foi encontrado valor superior a 100%. Essa quantidade no interior da cápsula pode ser explicada pelo motivo da cápsula ser grande e estar úmida, conseguindo comportar uma concentração maior e não há perdas de células viáveis. Zhao et al. (2018) ao encapsularem *L. platarum* encontraram eficiência de encapsulação de 112% a 131%. A eficiência de encapsulação da cápsula liofilizada foi menor, mostrando que a secagem pode ocasionar a diminuição da viabilidade dos probióticos (Li et al., 2011) e que não foi satisfatória neste estudo.

3.2 Viabilidade das cápsulas probióticas durante o período de armazenamento

Foram realizados testes para verificar a viabilidade do *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium bifidum* livres e encapsulados durante o período de armazenamento de 60 dias a 5 °C em cápsulas úmidas e do *Lactobacillus acidophilus* após liofilização (cápsulas secas).

A encapsulação provou ser um método eficiente para manter a viabilidade e a estabilidade dos probióticos, pois protege os microrganismos durante o armazenamento, bem

como nas condições gástricas (Martín; Lara-villoslada; Morales, 2015). Pelos dados da Tabela 2 é possível verificar que os microrganismos analisados de maneira livre, ou seja, ativados, mas sem estarem protegidos pela cápsula, possuem uma vida de prateleira curta, não apresentando células viáveis em 15 dias de armazenamento. Entretanto, os microrganismos encapsulados apresentam maior tempo de viabilidade, chegando alguns, como o *Lactobacillus acidophilus* e o *Lactobacillus rhamnosus* até 60 dias de estocagem com contagem superior a 7 log UFC g⁻¹. Holkem et al. (2016) estudaram a viabilidade de *B. bifidum* encapsulado e liofilizado e encontraram viabilidade de 7 log UFC g⁻¹ por 120 dias, armazenado em refrigeração de 7 °C, mostrando que a liofilização favoreu o aumento da vida de prateleira. Chávarri et al. (2010) também estudaram a viabilidade *B. bifidum* encapsulado e quando comparado com as células livres, notaram que a cápsula protegeu o microrganismo e ocasionou em maior tempo de vida de prateleira em temperatura de 5 °C.

As cápsulas que foram submetidas ao processo de liofilização, apresentaram baixa viabilidade (< 4 log UFC g⁻¹), portanto, não foram submetidas às análises de vida de prateleira. Durante os processos de secagem os probióticos experimentam várias tensões que incluem estresse térmico, desidratação, tensão de cisalhamento, estresse osmótico e oxidativo, e por esses motivos acredita-se que ocorra a diminuição da viabilidade dos probióticos (Perdana et al., 2013), sendo a liofilização, ainda, o método de secagem mais indicado, porém que apresenta alto custo (Broeckx et al., 2016; Jalali et al., 2012). Como a água desempenha um papel importante na integridade e estabilidade celular, sua remoção das partículas probióticas pode causar danos extensos às proteínas de superfície, à parede celular e à membrana celular, diminuindo a viabilidade probiótica após a secagem (Broeckx et al., 2016). No entanto, esses mecanismos de inativação das bactérias probióticas durante a secagem por congelamento (liofilização) ainda não são totalmente compreendidos, pois a literatura apresenta que existem diferenças na viabilidade entre diferentes gêneros e espécies, mas também entre a mesma linhagem, sugerindo que viabilidade durante a secagem está relacionada com a tolerância do microrganismo em conjunto com o processo de secagem escolhido e a cápsulas que o protege (Fu; Chen, 2011; Broeckx et al., 2016).

Quando avaliada a vida de prateleira das cápsulas probióticas, a cada 15 dias de armazenamento em temperatura máxima de 5 °C, é possível afirmar que até o dia 45 de armazenamento não houve crescimento de bolores e leveduras, bem como não havia contaminação por *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, *Salmonella* e coliformes termotolerantes. Porém, as análises do 60º dia de armazenamento mostraram crescimento de

bolores, superior a $5,0 \times 10^7$ em todas as cápsulas probióticas, o que impossibilita o consumo e encerra a vida de prateleira.

3.3 Teste de resistência *in vitro* das cápsulas probióticas às condições gastrointestinais

Os testes *in vitro* mostraram que as cápsulas suportaram e protegeram o microrganismo durante a passagem pelo esôfago e estômago, havendo rompimento das cápsulas somente no duodeno e íleo (Tabela 3). Os três microrganismos analisados, de maneira livre e encapsulados, obtiveram viabilidade na passagem pelo duodeno e íleo semelhante a inicial, porém, somente o *L. acidophilus* não apresentou diferença significativa.

O *L. acidophilus* se torna mais resistente quando encapsulado em partículas de alginato, enquanto o *Bifidobacterium* sp. são mais sensíveis, sendo indicado revestimentos na cápsula para sua sobrevivência por maior tempo, além disso, também são menos resistentes aos ácidos gástricos e condições de armazenamento (Shori, 2017).

Desfechos favoráveis são descritos na literatura quanto à eficiência do revestimento de microrganismos visando melhorar a viabilidade probiótica no trato intestinal (Holkem et al., 2016; Chávarri et al., 2010; Fritzen-Freire et al., 2013). A encapsulação em alginato é eficiente no aumento da resistência de bactérias probióticas em pH baixos (Iyer; Kailasapathy, 2005; Martín et al., 2015; Shori, 2017).

No estudo de Etchepare (2014), que submeteu as microcápsulas de alginato de sódio com *Lactobacillus acidophilus* às mesmas condições gastrointestinais, os resultados foram semelhantes quanto ao pH ácido do estômago, porém a viabilidade probiótica foi menor do que no teste realizado com as cápsulas probióticas neste estudo. Provavelmente, essa diferença está relacionada ao tamanho da cápsula, mostrando melhor eficiência para cápsulas de diâmetro maiores.

Pesquisa de Gbassi e Vandamme et al. (2012) mostrou melhora na capacidade de sobrevivência de *L. rhamnosus* em esferas de alginato em relação ao sistema de digestão simulado, que é confirmado pelo efeito protetor da matriz de alginato, sendo eficiente na manutenção do número de *L. rhamnosus* probiótico durante o armazenamento de 90 dias em refrigeração. A encapsulação de *L. acidophilus* por extrusão apresentou alto rendimento de encapsulação e afetou positivamente a viabilidade do microrganismo quando exposto a condições simulando o trânsito pelo trato gastrointestinal (Holkem et al., 2016; Martín et al., 2015; Gebara et al., 2013; Chávarri et al., 2010). Holkem et al. (2016) encontraram resultados

satisfatórios para *B. bifidum* encapsulado por extrusão durante a passagem pelo trato gastrointestinal.

3.4 Comportamento térmico das cápsulas probióticas

O comportamento térmico foi avaliado tanto nos microrganismos livres como nos encapsulados. Na Figura 2 é possível observar que os microrganismos encapsulados, que receberam proteção das cápsulas, conseguiram resistir a temperaturas mais elevadas, diferentemente dos microrganismos livres, que tiveram redução logarítmica em temperaturas mais baixas.

Quando submetidos a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ o *L. acidophilus* encapsulado chega a 120 dias de armazenamento apresentando uma viabilidade acima de 6 log UFC g^{-1} , porém para adição em produtos e consumo é considerada baixa essa concentração, pois durante a passagem pelo trato gastrointestinal, essa concentração irá diminuir e não ofertará o benefício probiótico. Souza et al. (2014) verificaram o efeito negativo do congelamento na viabilidade dos probióticos encapsulados em alginato, devido as alterações físicas das partículas durante a estocagem. Os autores sugeriram a utilização de crioprotetores ou outros polímeros em conjunto com o alginato, para evitar alterações na estrutura que afetariam diretamente a viabilidade dos probióticos.

Ao manter em temperatura ambiente ($25\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$), os microrganismos encapsulados não sobrevivem, havendo inviabilidade total em sete dias. Ao ser submetido ao comportamento térmico de 50, 75 e $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, pode-se perceber que a cápsula protege o microrganismo na temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, porém há uma diminuição de sua viabilidade. Ao ser submetido a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$, a cápsula ainda consegue proteger os microrganismos, porém apresenta uma contagem média de 2 log UFC g^{-1} , o que é considerado insatisfatório. Ao ser submetido a temperatura de $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, nenhum microrganismo sobrevive e ocorre a desestruturação das cápsulas.

Essa proteção térmica da cápsula, se deve as propriedades de termotolerância do alginato, que confere estabilidade as cápsulas e ao microrganismo, podendo ser adicionados em alimentos processados (Garcia Cruz; Foggetti; Silva, 2008). O impacto da temperatura de armazenamento na viabilidade de probióticos é bem conhecido, sendo que quanto maior a temperatura, menor a taxa de sobrevivência ao longo do tempo. O armazenamento em temperaturas refrigeradas geralmente dá a melhor estabilidade (Lapsiri et al., 2012; Schuck et al., 2013).

Resultados de Etchepare (2014), Shori (2017) sugerem que a encapsulação de *L. acidophilus* utilizando alginato de sódio como principal material de revestimento pode aumentar a sobrevivência celular durante a estocagem em temperatura ambiente. Mirzaei et al., (2012) afirmam que a encapsulação é capaz de manter células viáveis de *L. acidophilus* em condições de refrigeração por até 180 dias.

3.5 Caracterização físico-química

Os resultados da composição físico-química das cápsulas (Tabela 4) mostram um alto teor de umidade, atividade de água e pH baixo, características esperadas para esse produto. Segundo Ying et al. (2013) a atividade de água e umidade das cápsulas devem ser mantidas o menor possível, para evitar o crescimento de microrganismos prejudiciais e reações bioquímicas indesejáveis durante o armazenamento. Entretanto, neste estudo não se obteve resultados satisfatórios, quanto a viabilidade dos microrganismos, com o uso de cápsulas secas. Simeoni (2015) em estudo que avaliou a composição das cápsulas encontrou valores médios de atividade de água de 0,9% e umidade de 95%, e observou que esses fatores não prejudicaram a viabilidade dos microrganismos probióticos, o que corrobora com o estudo realizado. Valores elevados de umidade são característicos de partículas produzidas com polissacarídeos formadores de géis, devido sua elevada capacidade de retenção de água (Martín et al., 2015).

3.6 Avaliação do diâmetro

Na Tabela 5 é possível conhecer o diâmetro médio das cápsulas probióticas úmidas. Entre as repetições da análise, foi encontrado menor valor próximo a 1,5 mm e diâmetro máximo próximo de 2,5 mm. O tamanho médio das cápsulas torna visível a presença no alimento, porém, comporta uma quantidade maior de microrganismos em seu núcleo, o que contribui para o aumento da eficiência da encapsulação. Além disso, este processo de encapsulação é conhecido por produzir cápsulas com tamanho entre 2 e 5 mm (Krasaekoopt et al., 2003) o que mostra que o presente estudo desenvolveu partículas com um tamanho considerado adequado. Cavalheiro (2016) em seu estudo que utilizou a mesma técnica para produção de cápsulas probióticas, obteve partículas com tamanho médio de 3,6 mm. Su et al. (2019), produziu cápsulas de alginato por extrusão encapsulando proteínas e obteve diâmetro médio de 2,3 mm. Camacho et al. (2019) encapsulou ácido fólico utilizando a mesma

metodologia e encontrou diâmetro médio de 3,5 mm, mostrando que o tamanho de cápsulas encontrado nesse estudo corrobora com os achados por demais autores.

3.7 Caracterização morfológica

A microscopia é uma ferramenta importante para analisar a produção e as características das cápsulas, como estrutura externa e arranjo molecular (Allan-Wojtas et al., 2008). A fim de observar a forma, o tamanho e a superfície das partículas, por meio do microscópio óptico Zeiss Scope.A1, foi realizada avaliação morfológica das cápsulas contendo *L. acidophilus*, visto que foi o microrganismo que apresentou maior viabilidade e eficiência de encapsulação. A observação microscópica das partículas determina a morfologia externa, a estrutura interna, o tamanho, a superfície e a distribuição dos microrganismos na matriz encapsulante.

A análise das cápsulas por microscopia óptica (Figuras 3 e 4) revelou partículas esféricas, com tamanho uniforme, de superfície lisa e com recheio distribuído por toda a matriz, semelhante aos resultados encontrados por outros estudos (Simeoni, 2015; Boscarlioli, 2010; Etchepare, 2014; Santos, 2013).

As cápsulas úmidas, de modo geral, apresentam forma esférica e distribuição de recheio por toda a matriz. É possível verificar que a encapsulação de bactérias probióticas foi eficiente, pois consegue-se visualizar a presença de material encapsulante e microrganismos em todo o interior da cápsula.

A morfologia das partículas liofilizadas (secas) por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou uma perda da forma esférica, apresentando forma irregular, e cápsulas de tamanhos variados (Figura 5 e 6). É possível observar uma camada de superfície densa e um núcleo solto, com presença de microrganismos em ambas as partes. As cápsulas secas por liofilização resultam na formação de cristais de gelo e a sublimação dos cristais de gelo sob pressão reduzida, resulta na formação de um produto seco poroso com formas irregulares (Dolly et al., 2011).

4 CONCLUSÃO

A encapsulação por gelificação iônica obteve uma eficiência de encapsulação satisfatória e mostrou-se favorável para manter a viabilidade de microrganismos probióticos. A cápsula protegeu o microrganismo na simulação da passagem pelo trato gastrointestinal,

liberando o microrganismo apenas a partir da fase do duodeno. Entre as três culturas estudadas, o *Lactobacillus acidophilus* foi o que apresentou resultados mais satisfatórios, seguido pelo *Lactobacillus rhamnosus*. O *Bifidobacterium bifidum* apresentou resultado insatisfatório durante a vida de prateleira.

Os microrganismos probióticos apresentaram uma viabilidade maior estando encapsulados e na forma úmida. Na forma livre, os microrganismos não apresentaram concentração suficiente para enquadrar-se como produto probiótico. Igualmente ocorreu quando as cápsulas probióticas foram submetidas a secagem por liofilização, que não apresentaram resultados positivos, mostrando que a cápsula úmida possui melhor viabilidade e concentração de bactérias no interior da cápsula, o que resultou em uma eficiência de encapsulação superior a 100%.

Em relação a viabilidade da cultura probiótica durante os períodos e temperaturas de armazenamento pode se concluir que a cápsula proporciona uma vida de prateleira mais longa ao microrganismo quando congelado e que a encapsulação confere maior estabilidade às bactérias probióticas, podendo assim, ser adicionados em alimentos processados.

Ressalta-se que a vida de prateleira das cápsulas úmidas encerra-se com 45 dias de armazenamento por conta do crescimento de microrganismos deteriorantes nas cápsulas, conforme mostraram os resultados de vida de prateleira, porém as cápsulas contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhamnosus* apresentavam viabilidade até os 60 dias de armazenamento.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

Allan-Wojtas, P. et al (2008). Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. *Food Science and Technology*, v. 41, n. 1, p. 101–108.

Almeida, J. M. et al (2018). Microrganismos Probióticos e o seu Uso na Indústria de Alimentos. *International Journal of Nutrology*, v. 11, n. 1.

AOAC (2005). *Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists*. (18th ed.). Gaithersburg, Maryland.

Arriola, N. D. A. et al (2019). Encapsulation of stevia rebaudiana Bertoni aqueous crude extracts by ionic gelation – Effects of alginate blends and gelling solutions on the polyphenolic profile. *Food Chemistry*, n. 275, p. 123–134.

Boscariolli, M. P.M (2010). *Influência de prebióticos na encapsulação de bactérias próbioticas adicionadas em sorvete*. 72f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia. São Caetano do Sul – SP.

Brasil (2001). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC N° 12, de 02 de janeiro de 2001. 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*. Poder Executivo, de 10 de janeiro de 2001.

Brasil (2003). Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa N° 62, 26 de Agosto de 2003. 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial da União*, de 18/09 2003, Seção 1, Página 14. Ministério da Agricultura.

Broeckx, G. et al. (2016). Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 505, n. 1–2, p. 303–318.

Camacho, D. H., Uy, J. S. Y., Cabrera, M. J. F., Lobregas, M. O. S., Fajardo, T. J. M. C. (2019). Encapsulation of folic acid in copper-alginate hydrogels and its slow *in vitro* release in physiological pH condition. *Food Research International*, v. 119, p. 15-22.

Cavalleiro, C. P. (2016). *Probióticos encapsulados aplicados em produtos cárneos*. 151p. Tese (Doutorado) do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

Chávarri, M. et al (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, v. 142, p. 185-189.

Chen, H. Y. et al (2017). Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, v. 29, p. 248–255.

De Prisco, A.; Mauriello, G. (2016). Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. *Trends in Food Science & Technology*, v. 48, p. 27-39.

Dolly, P. et al (2011). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) by spray-freezedrying method and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Microencapsulation*, v. 28, n. 6, p. 568-574.

Dordevic, V., Balanc, B., Belscak-Cvitanovic, A., Levic, S., Trifkovic, K., Kalusevic, A., & Nedović, V. (2015). Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews*, v. 7, n. 4, p. 452–490.

Etchepare, M. A. (2014). *Produção, caracterização e viabilidade de micropartículas com Lactobacillus acidophilus obtidas por gelificação iônica*. 120 p. Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

FAO/WHO (2002). Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Diretrizes para a avaliação de probióticos em alimentos*. London, Ontario, Canada. April 30 and May 1.

Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Pinto, S. S., Muñoz, I. B., Amboni, R. D. M. C. (2013). Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. *LWT - Food Science and Technology*, v. 50, p. 39-44.

Fu, N.; Chen, X. D. (2011). Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International*, v. 44, p. 1127-1149.

Garcia-Cruz, C.; Foggetti, U.; Silva, A. (2008). Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos característicos e produção. *Química Nova*, v. 31, n.7, p. 1800-1806, 2008.

Gbassi, G. K.; Vandamme, T. (2012). Probiotic Encapsulation Technology: from Microencapsulation to Release into the Gut. *Pharmaceutics*, v. 4, n. 1, p. 149-163.

Gebara, C. et al (2013). 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.

Holkem, A. T.; Raddatz, G. C.; Nunes, G. L. et al. (2016). Development and characterization of alginate microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 produced by emulsification/internal gelation followed by freeze drying. *LWT - Food Science and Technology*, v. 71, p. 302-308.

Iyer, C.; Kailasapathy, K. (2005). Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt. *Journal of Food Science*, v.70, p.18-23.

Jalali, M.; Abedi, D.; Varshosaz, J.; Najjarzadeh, M.; Mirlohi, M.; Tavakoli, N. (2012). Stability evaluation of freeze-dried *Lactobacillus* tolerance and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in oral capsules. *Research in Pharmaceutical Sciences*, v. 7, p. 31-36.

Kailasapathy, K. (2009). Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. *Revisões da CAB: Perspectivas na Agricultura, Ciências Veterinárias, Nutrição e Recursos Naturais*, v. 4, n.33, p.1-19, 2009.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2004). The influence of coating material on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, v.14, n.8, p. 737-743.

Krasaekoopt, W.; Bhandari, B.; Deeth, H. Review: Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, v. 13, p. 3-13, 2003.

Lapsiri, W., Bhandari, B., Wanchaitanawong, P. (2012). Viability of *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 in different protectants during spray drying and storage. *Drying Technology*, v. 30, p. 1407-1412.

Li, Y. et al (2011). Controlling lipid digestion by encapsulation of protein-stabilized lipid droplets within alginate-chitosan complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, v.25, p. 1025-1033.

Madureira, A. R. et al (2011). Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, v. 44, p. 465–470, 2011.

Mandal, S. et al (2006). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 1190-1195, 2006.

Martín, M. J.; Lara-villoslada, F.; Ruiz, M. A.; Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 27, p. 15-25.

Martín, M. J.; Lara-villoslada, F.; Ruiz, M. A.; Morales, M. E. (2013). Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. *LWT - Food Science and Technology*, v. 53, n.2, p. 480-486.

Mirzaei, H. et al (2012). Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* La5 and sensory properties in Iranian white brined cheese. *Food Chemistry*, v.132, n.4, p.1966-1970.

Organização das Nações Unidas (2019) – *Organização das Nações Unidas*. 2018. Site <<https://www.unfpa.org/data/world-population-dashboard>> Acesso em: 14 de abril de 2019.

Ota, A. et al. Encapsulation of pantothenic acid into liposomes and into alginate or alginate e pectin microparticles loaded with liposomes. *Journal of Food Engineering*, n. 229, p. 21-31, 2018.

Perdana, J. et al. (2013). Dehydration and thermal inactivation of *Lactobacillus plantarum* WCFS1: Comparing single droplet drying to spray and freeze drying. *Food Research. International*, v. 54, p. 1351-1359.

Rodríguez Y. A. et al (2016). Encapsulación de probióticos para aplicaciones alimenticias. *Revista Biosalud*, v.15, n.2, p. 106-115, 2016.

Sabikhi, L. et al (2010). Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 processing heat treatments and simulated gut conditions. *Food Bioprocess Technology*, v. 3, p. 586-593.

Santos, R. C. S (2013). *Microencapsulação de Lactobacillus casei por Spray Drying*. 104 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Schuck, P., Dolivet, A., Méjean, S., Hervé, C., Jeantet, R. (2013). Spray drying of dairy bacteria: new opportunities to improve the viability of bacteria powders. *International Dairy Journal*, v. 31, p. 12-17.

Shori, A. B. (2017). Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit. *Journal of Biosciences*, v.24, n.1, p. 1-5.

Simeoni, C. P. et al (2014). Microencapsulação de probióticos: Inovação tecnológica na indústria de alimentos. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, v. 18. Ed. Especial, p. 66-75.

Simeoni, C. P. (2015). *Elaboração de doce de leite light contendo probióticos microencapsulados*. 125f. Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

Sohail, A. et al (2011). 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.

Souza, V. B. et al (2014). Functional properties and stability of spray-dried pigments from Bordo grape (*Vitis Labrusca*) winemaking pomace. *Food Chemistry*, Amsterdam, v. 164, p.380-386.

Su, Y., Gu, L., Zhang, Z., Chang, C., Li, J., McClements, D. J., Yang, Y. (2019). Encapsulation and release of egg white protein in alginate microgels: Impact of pH and thermal treatment. *Food Research International*, v. 120, p. 305-311.

Urbanska, A. M. et al (2007). Live encapsulated *Lactobacillus acidophilus* cells in yogurt for therapeutic oral delivery: Preparation and in vitro analysis of alginate-chitosan microcapsules. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 85, n. 9, p. 884-893.

Ying, D. et al (2013). 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.

Zhao, M. et al. (2018). Ambient storage of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* ST-III by complex coacervation of type-A gelatin and gum Arabic. *Food & Function*, v. 9, p. 1000-08.

Tabela 1 – Eficiência de encapsulação (EE) das cápsulas probióticas.

Cápsula úmida	EE (%)	Cápsula liofilizada	EE (%)
<i>L. acidophilus</i>	116.13±2.87		
<i>L. rhamnosus</i>	72.22±1.82	<i>L. acidophilus</i>	37.51±0.44
<i>B. bifidum</i>	110.85±1.90		

Média obtida ± desvio padrão das três repetições da experimentação, todas realizadas em triplicatas.

Fonte: Autora.

Tabela 2 - Resultado dos testes de viabilidade dos microrganismos probióticos encapsulados (1%) durante o período de 60 dias de armazenamento sob refrigeração (5 °C). Resultados expressos em log UFC g⁻¹. O teste de vida de prateleira foi realizado apenas para as amostras que apresentaram contagem superior a 6 log UFC g⁻¹ no tempo zero.

Amostra	Dias de armazenamento				
	0	15	30	45	60
Cápsulas úmidas					
<i>L. acidophilus</i> livre	10,81±0,13 ^a	N.D.	-	-	-
<i>L. acidophilus</i> encapsulado	10,93±0,12 ^{aA}	9,75±0,09 ^B	8,87±0,14 ^C	8,42±0,10 ^D	8,38±0,05 ^D
<i>L. rhamnosus</i> livre	8,72±0,08 ^a	N.D.	-	-	-
<i>L. rhamnosus</i> encapsulado	8,62±0,14 ^{bA}	8,55±0,11 ^A	7,92±0,16 ^B	7,88±0,10 ^B	7,75±0,13 ^C
<i>B. bifidum</i> livre	6,31±0,11 ^b	N.D.	-	-	-
<i>B. bifidum</i> encapsulado	6,46±0,14 ^{aA}	5,83±0,13 ^B	2,38±0,09 ^C	N.D.	-
Cápsulas secas					
<i>L. acidophilus</i> livre	9.02±0.10 ^a	N.D.	-	-	-
<i>L. acidophilus</i> encapsulado*	3.66±0.08 ^b	-	-	-	-

Médias obtidas ± desvio padrão das três repetições da experimentação, todas realizadas em triplicatas. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha (entre cada espécie de microrganismo), não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

N.D. = não detectado.

Fonte: Autora.

Tabela 3 – Resultado do teste *in vitro* da sobrevivência dos probióticos às condições gastrointestinais simuladas. Resultados expressos em log UFC g⁻¹.

Contagem das células probióticas viáveis				
	Inicial	Estômago	Duodeno	Íleo
<i>L. acidophilus</i> livre	8,94±0,17 ^{bA}	7,02±0,19 ^{aA}	6,56±0,13 ^{aA}	6,32±0,22 ^{aA}
<i>L. acidophilus</i> encapsulado	8,98±0,12 ^{aA}	4,97±0,15 ^{bC}	7,24±0,20 ^{bB}	7,21±0,18 ^{aA}
<i>L. rhamnosus</i> livre	7,92±0,14 ^{aA}	6,31±0,10 ^{aA}	6,28±0,08 ^{aA}	6,01±0,11 ^{bB}
<i>L. rhamnosus</i> encapsulado	7,22±0,21 ^{aA}	3,97±0,11 ^{bC}	7,39±0,10 ^{aB}	7,00±0,05 ^{aB}
<i>B. bifidum</i> livre	6,11±0,13 ^{bA}	5,56±0,08 ^{aB}	5,42±0,12 ^{bB}	5,55±0,11 ^{aB}
<i>B. bifidum</i> encapsulado	6,74±0,14 ^{aA}	3,89±0,10 ^{bD}	5,91±0,15 ^{aC}	6,02±0,12 ^{aB}

Médias obtidas das três repetições da experimentação, todas realizadas em triplicatas, seguidas ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha (entre cada espécie de microrganismo), não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Fonte: Autora.

Tabela 4 – Resultado das análises físico-químicas da cápsula contendo bactérias probióticas.

	Proteína	Umidade	Cinzas	Gordura	Aa	pH
	(%)	(%)	(%)	(%)		
Cápsulas probióticas	0,40±0,07	96,88±0,06	0,24±0,01	0,00±0,01	0,98±0,01	4,49±0,03

Média ± desvio padrão obtida das três repetições da experimentação, todas realizadas em triplicatas.

Fonte: Autora.

Tabela 5 – Médias dos tamanhos das partículas probióticas úmidas.

Partícula	Diâmetro (mm)
Cápsula úmida	1,87

Média obtida das seis repetições da experimentação, todas realizadas em triplicatas.

Fonte: Autora.

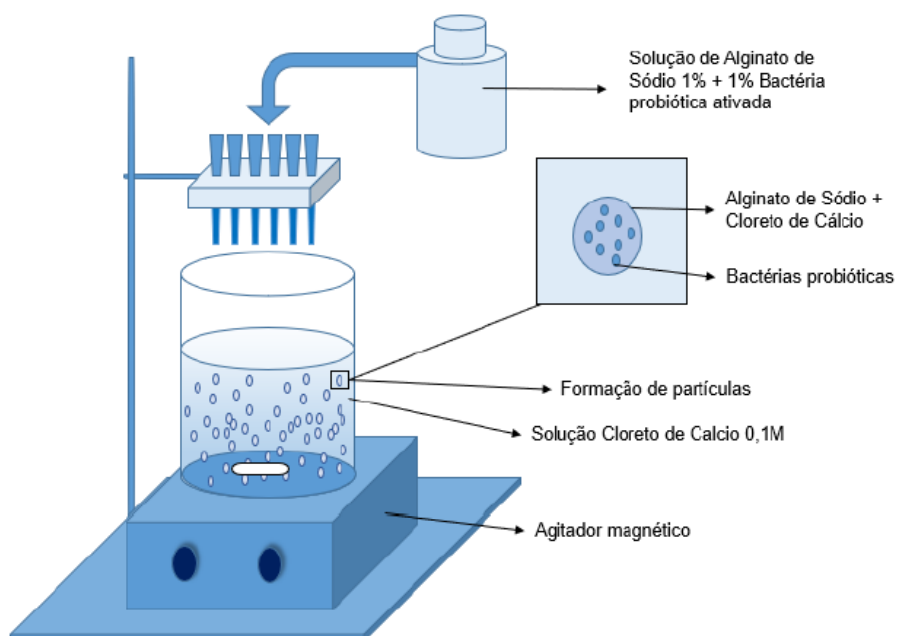


Figura 1 – Esquema da produção de cápsulas probióticas pelo método de encapsulação por extrusão.

Fonte: Autora.

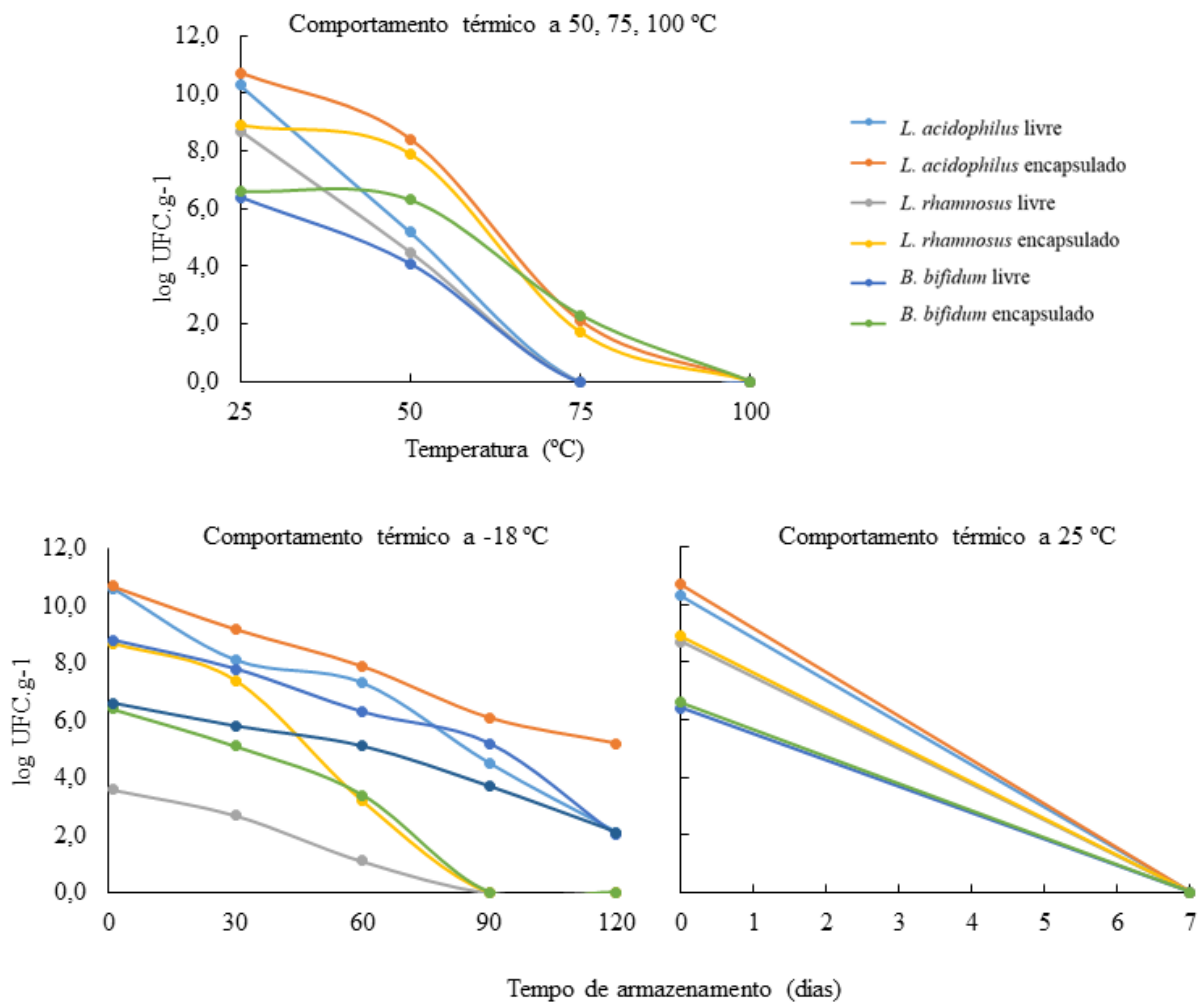


Figura 2 – Resultado do teste de viabilidade probióticas dos microrganismos livres e encapsulados durante análise de comportamento térmico. Resultados expressos em log UFC g⁻¹.

Fonte: Autora.



Figura 3 – Microfotografias óptica das cápsulas de alginato de sódio contendo *Lactobacillus acidophilus*, partidas ao meio, em aumento de 5 x (A) 20 x (B) e 40 x (C).

Fonte: Autora.

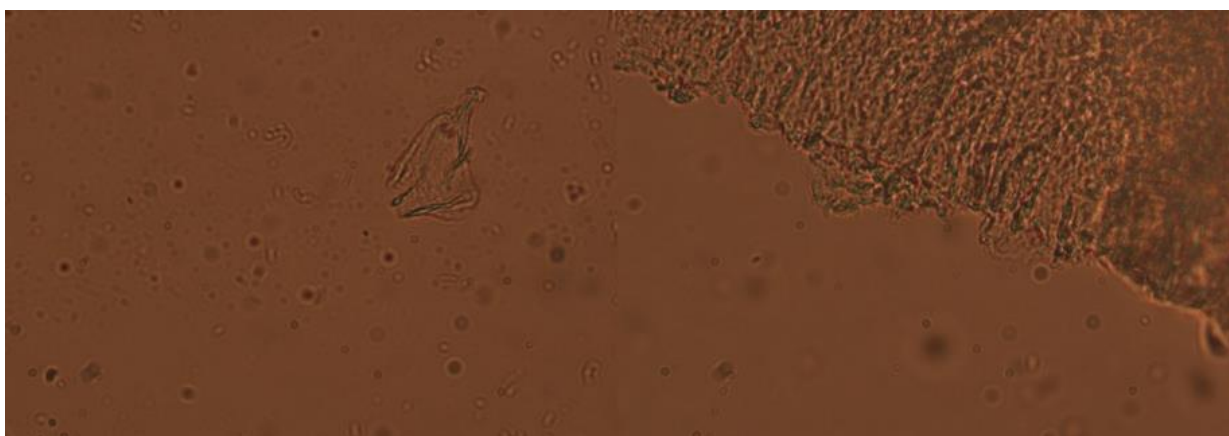


Figura 4 – Microfotografias óptica das cápsulas de alginato de sódio contendo *Lactobacillus acidophilus*, em aumento de 100 x.

Fonte: Autora.

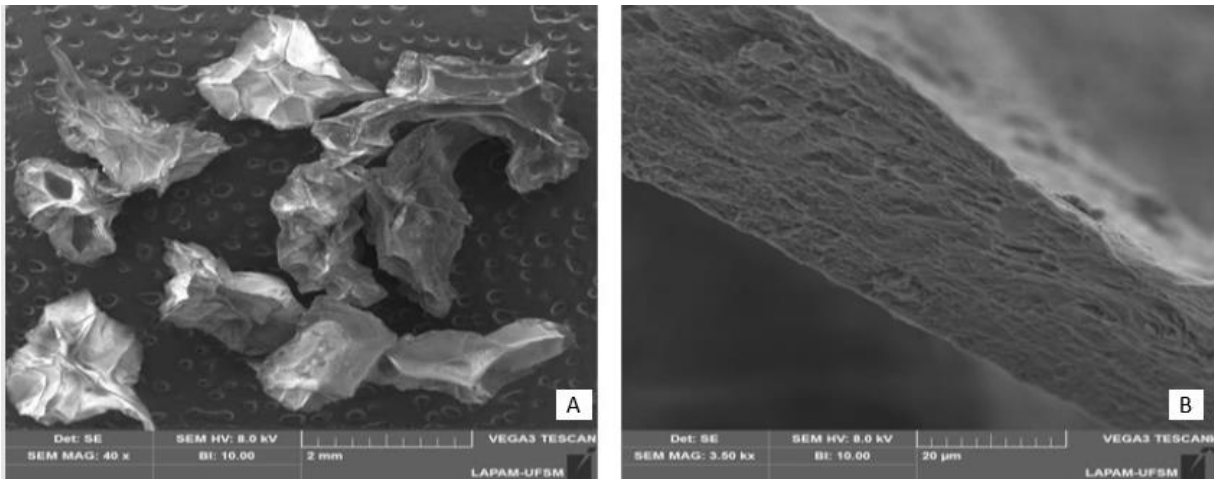


Figura 5 - Morfologia das cápsulas probióticas secas, as cápsulas íntegras em aumento de 40 x (A) e a parede das cápsulas (B), em aumento de 3500 x.

Fonte: Autora.

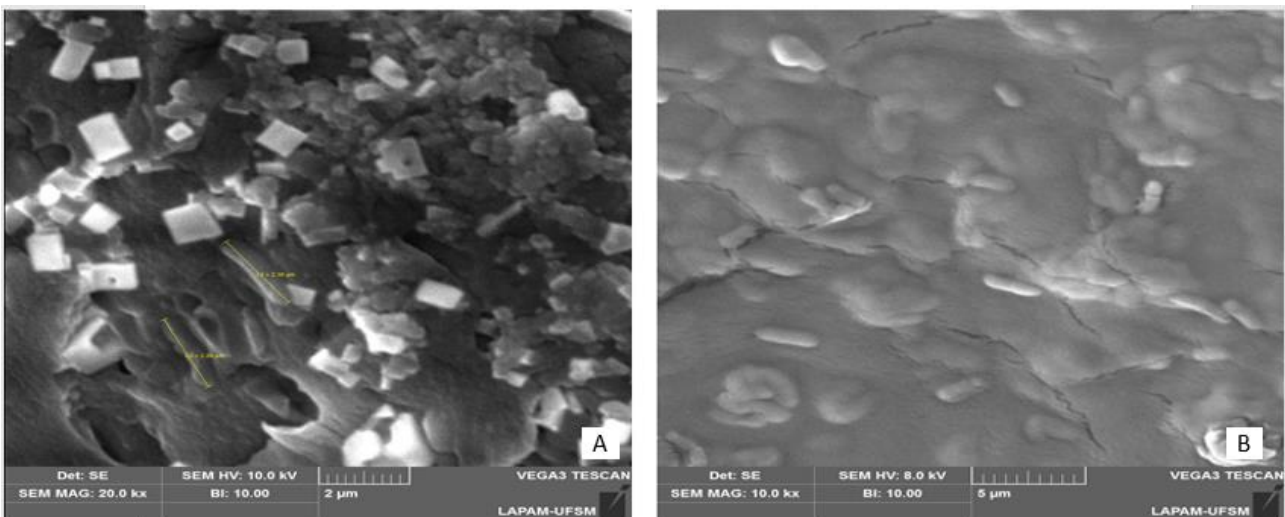


Figura 6 - Morfologia das cápsulas probióticas secas, em aumento de 20000 x (A) e 10000 x (B), que indicam a presença do *L. acidophilus*.

Fonte: Autora.

3.5 MANUSCRITO 3

PERFIL TECNOLÓGICO E FUNCIONAL DE MANTEIGA PROBIÓTICA COM SAL HIPOSSÓDICO

SILVA¹, Maritiele Naissinger da; RICHARDS², Neila Silvia Pereira dos Santos (...)

¹Doutoranda. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: maritielens@gmail.com

²Professora orientadora. Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: neilarichardsprof@gmail.com

RESUMO

A manteiga é um dos produtos lácteos mais antigos, tendo um papel significativo na alimentação humana por ser uma das principais fontes de gordura e uma importante fonte de energia. A manteiga é pouco explorada para a adição de ingredientes funcionais em sua composição. Buscando o desenvolvimento de uma manteiga probiótica, o objetivo deste estudo desenvolver manteiga com *Lactobacillus acidophilus* encapsulado e sal hipossódico, bem como, avaliar a viabilidade probiótica durante o período de armazenamento e simular a passagem pelo trato gastrointestinal, além de caracterizar o produto por meio de análises físico-químicas, tecnológicas e sensoriais. A encapsulação foi realizada através da técnica de extrusão, com solução de alginato de sódio 1,0% m/v e solução de cloreto de cálcio 0,1 mol L⁻¹. As formulações seguiram o delineamento fatorial 2², sendo as variáveis, o sal hipossódico e o teor de cápsulas adicionadas. Dois tratamentos foram elaborados para controle, sendo um deles com nenhuma adição e o outro com adição de células de *Lactobacillus acidophilus* livres ativadas. As formulações foram armazenadas a 5 °C e analisadas a cada 15 dias, ao longo de 60 dias, a fim de avaliar a viabilidade do microrganismo, por meio de contagem bacteriana de células em meio ágar MRS. Os testes mostraram que os tratamentos com adição de 10% de cápsulas apresentaram maior viabilidade probiótica do microrganismo. A vida de prateleira das cápsulas e das manteigas probióticas encerrou-se com 45 dias de armazenamento, pois no dia 60 apresentaram contagem bacteriana para probiótico insatisfatória e crescimento de bolores.

Palavras-chave: Encapsulação; Microcápsulas; DSC; Análise sensorial, Perfil lipídico.

INTRODUÇÃO

Há uma diversidade de produtos fabricados através do processamento do leite, dentre eles, a manteiga. A manteiga é um dos produtos lácteos mais antigos, tendo um papel significativo na alimentação humana por ser uma das principais fontes de gordura e uma importante fonte energética (Tvrzicka et al., 2011). É um alimento tradicional, amplamente produzido e consumido em todo o mundo, diretamente ou como ingrediente em alimentos processados (Ahmed et al., 2016).

Entende-se por manteiga o produto gorduroso obtido exclusivamente pela bateção e malaxagem, com ou sem modificação biológica da nata pasteurizada derivada exclusivamente do leite de vaca, por processos tecnologicamente adequados. A matéria gorda da manteiga deverá estar composta exclusivamente de gordura láctea. A manteiga sem sal deve apresentar teor mínimo de 82% de gordura, e com sal de 80% (Brasil, 1996).

Os consumidores têm se preocupado cada vez mais com a qualidade nutricional dos alimentos, e por isso têm aumentado a procura por alimentos que, além de nutrir, proporcionem benefícios à saúde, em especial os alimentos probióticos (Claes et al., 2015; Hill et al., 2014). A maioria dos alimentos probióticos é categorizada como alimentos funcionais, compreendendo entre 60 e 70% de todo o mercado desses alimentos (Tripathy; Giri, 2014). Existem vários estudos que relatam o uso de probióticos em derivados lácteos como iogurte, queijo, sorvete e em manteiga (Gomes et al., 2011; Salam et al., 2011; Sánchez et al., 2012; Ranadheera et al., 2013; Erkaya et al., 2015).

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos, que quando administrados em quantidade adequada conferem benefícios para a saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002), através da regulação da imunidade local e sistêmica e pela melhora do balanço nutricional e microbiano no trato intestinal (Menezes et al., 2013). Um alimento vendido com alegações de trazer benefícios à saúde devido à adição de probióticos deve conter um número de células viáveis de culturas probióticas de, pelo menos, 10^6 a 10^7 UFC/g (FAO/WHO, 2002), e para que ocorra ação benéfica no intestino, devem ser capazes de sobreviver à acidez estomacal e aos sais biliares (Champagne et al., 2011). Porém, a viabilidade do microrganismo probiótico é afetada por fatores intrínsecos e extrínsecos do alimento, como a interação entre espécies presentes, pH, produção de compostos voláteis, armazenamento e temperatura (Iravani et al., 2015). Por isso, o desafio na incorporação de probióticos em alimentos está em manter a viabilidade das bactérias durante o processamento e período de armazenamento até o consumo do produto (Granato et al., 2010).

As culturas probióticas podem ser significativamente protegidas através da técnica de encapsulação (Ying et al., 2013). Esse processo consiste no revestimento de microrganismos por uma matriz encapsulante, proporcionando proteção contra condições adversas, aumentando sua viabilidade e estabilidade (Gbassi, Vandamme, 2012). O agente encapsulante forma uma cápsula que se desfaz através de estímulo específico, liberando as substâncias ativas no local ideal (Sohail et al., 2011). Na área de alimentos tem sido uma alternativa empregada para resolver os problemas de instabilidade e inviabilidade de probióticos (Kailasapathy, 2009), possibilitando ainda o desenvolvimento de novos produtos.

Uma das espécies mais populares de microrganismos probiótico que normalmente são adicionados a produtos alimentícios são os *Lactobacillus*, por serem habitantes dominantes no intestino humano e pela capacidade de tolerarem melhor as condições ácidas (Corona-Hernandez et al., 2013). A temperatura ótima para o crescimento de *Lactobacillus acidophilus* é de 40-42 ° C, e uma grande perda de viabilidade ocorre quando a temperatura for superior a 45 ° C (Tripathi; Giri, 2014). Assim, o encapsulamento é empregado para fornecer uma barreira física efetiva aos fatores ambientais que são prejudiciais aos probióticos (Tripathi; Giri, 2014, Chen, et al., 2010).

Além da inclusão de probióticos, a redução de sódio vem sendo uma estratégia das indústrias de alimentos para atender a demanda dos consumidores pela busca de produtos mais saudáveis (Roberfroid, 2007). O consumo excessivo de sal foi identificado como um fator de risco importante para doenças cardiovasculares, já que o seu consumo pode estar associado ao aumento da pressão arterial. Em países desenvolvidos a ingestão ultrapassa o limite máximo de 2.4 g de sal por pessoa por dia, recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo que a maior parte deste sódio provém de alimentos industrializados (Ignácio et al., 2013). Portanto, a redução de sódio é uma forte ferramenta para a prevenção e o controle da hipertensão arterial sistêmica (Barros et al., 2013).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver manteiga probiótica por meio da adição de *Lactobacillus acidophilus* encapsulado, com teor reduzido de sódio, bem como, avaliar a viabilidade probiótica da manteiga durante o período de armazenamento e simulação gastrointestinal, avaliar a aceitação e caracterizar através de análises físico-químicas, calorimetria diferencial de varredura (DSC) e análise de textura.

METODOLOGIA

Elaboração da manteiga adicionada de cápsulas contendo *Lactobacillus acidophilus* e sal hipossódico

A manteiga foi desenvolvida a partir da gordura do leite de vacas da raça Jersey. As vacas da raça Jersey caracterizam-se por apresentarem um alto teor de sólidos totais quando comparadas as vacas da raça Holandesa (Buldo; Wiking, 2016). O desnate ocorreu de maneira natural, após repouso de 12 horas do leite em refrigeração. A nata era separada, e colocada em recipientes herméticos, sendo armazenada sob congelamento (- 18 °C) e transportada para a Universidade Federal de Santa Maria em caixas térmicas contendo gelo sintético, não ultrapassando a temperatura de - 12 °C.

A nata foi padronizada a 35% de gordura com adição de leite desnatado e submetida a pasteurização a 65 °C por 30 minutos, sendo, posteriormente, resfriada a 10 °C. Após, foi realizada a inversão de fases através da batidura e malaxagem. Na etapa da malaxagem foi adicionado o sal hipossódico NutraSal® (50% cloreto de sódio e 50% cloreto de potássio) e então, as cápsulas contendo *Lactobacillus acidophilus* foram adicionadas. A manteiga probiótica foi embalada em potes plásticos de 120 g e conservada sob refrigeração em temperatura máxima de 5 °C.

As formulações seguiram o delineamento fatorial 2² (Tabela 1). Dois tratamentos foram elaborados para controle, sendo denominados: T1 – nenhuma adição e T2 – adição de células de *L. acidophilus* livres ativadas.

Tabela 1 - Variáveis e níveis do delineamento experimental para as manteigas probióticas.

Variáveis independentes	Nível de variação					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Cultura probiótica livre (<i>L. acidophilus</i>) (%)	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cápsulas probióticas (<i>L. acidophilus</i>) (%)	0,0	0,0	5,0	5,0	10,0	10,0
Sal hipossódico (%)	0,0	0,0	1,0	0,5	0,5	1,0

Fonte: Autora.

Encapsulação e contagem das células probióticas viáveis

Para a encapsulação do *Lactobacillus acidophilus*, foi utilizada a técnica de extrusão e seguida as recomendações propostas por Krasaekoopt, Bhandari, Deeth (2004), Etchepare (2014) e Cavalheiro (2016), com adaptações no equipamento que produz as partículas.

A matriz encapsulante utilizada na elaboração das cápsulas foi o alginato de sódio de baixa viscosidade (Dinâmica[®]) na concentração de 1.0% m/v, gotejado no material de cobertura, cloreto de cálcio dihidratado 0,1 mol L⁻¹ (Synth[®]). A cultura probiótica utilizada foi *Lactobacillus acidophilus* (La-14) liofilizada, da marca Danisco[®], gentilmente doada pela empresa Fermentech, e mantida à - 18 °C.

Para determinar a concentração de *Lactobacillus acidophilus* presente na solução e para a contagem das células probióticas encapsuladas e adicionadas na manteiga, realizou-se plaqueamento em ágar MRS (Kasvi[®]). As placas foram incubadas em jarra de anaerobiose, em estufa bacteriológica a 37 °C por 72 h. O procedimento para o preparo de diluição das cápsulas, consistiu em pesar 1 g de microrganismos ativado e adicionar 9 mL de água peptonada, e 1 g de cápsula úmida e 1 g dos tratamentos de manteiga contendo as cápsulas e adicionar 9 mL de solução tampão fosfato estéril (pH 7,5), de acordo com metodologia descrita por Sheu e Marshall (1993).

Vida de prateleira e viabilidade probiótica

As formulações de manteigas foram armazenadas por um período de 60 dias, sob refrigeração, em temperatura máxima de 5 °C. A análise da viabilidade dos probióticos durante a vida de prateleira foi realizada seguindo a metodologia descrita anteriormente. Também foram realizadas análises para atestar a ausência dos seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, *Salmonella* sp., coliformes termotolerantes e bolores e leveduras (Brasil, 2001; Brasil, 2003; Brasil, 1996). Todas as análises foram realizadas no dia 0 (dia de fabricação) e, a cada 15 dias, até completar 60 dias de armazenamento.

Teste *in vitro* da sobrevivência dos probióticos às condições gastrointestinais simuladas

A viabilidade das manteigas probióticas frente às condições gastrointestinais foram avaliadas conforme descrito por Madureira et al. (2011). A viabilidade foi avaliada sequencialmente em meios que simulam as diferentes seções do trato gastrointestinal (esôfago/estômago, duodeno e íleo). Foram utilizadas alíquotas de 1 g de amostra adicionadas de 9 mL de água peptonada, sendo preparadas igualmente em três erlenmeyers e todos submetidos às mesmas condições para simulação gastrointestinal.

Previamente foram preparadas e autoclavadas uma solução ácida (HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e uma solução básica (NaHCO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) para ajuste do pH das amostras ao longo da simulação gastrointestinal. Inicialmente, o pH foi ajustado a 6,9, para simular a acidez da boca, permanecendo por dois minutos nessa condição e partindo para próxima etapa.

Na etapa esôfago-estômago utilizou-se 25 mg mL^{-1} de pepsina (Sigma[®]), preparada em HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, esta solução foi adicionada, em alíquotas iguais, durante toda a fase gástrica, a uma quantidade de $0,05 \text{ mL mL}^{-1}$, seguindo as seguintes etapas de pH/tempo (minutos): 5,5/10 minutos, 4,6/10 minutos, 3,8/10 minutos, 2,8/20 minutos, 2,3/20 minutos e 2,0/20 minutos em uma rotação de 130 rpm, adicionando a pepsina ($0,05 \text{ mL mL}^{-1}$) e sendo o pH ajustado utilizando HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em cada etapa. Ao final desta fase, era retirado um dos erlenmeyers e submetido imediatamente as análises de contagem de células probióticas viáveis correspondentes ao estômago.

Na etapa referente ao duodeno utilizou-se, a uma concentração de $0,25 \text{ mL mL}^{-1}$, uma solução contendo 2 g L^{-1} de pancreatina (Sigma[®]) e 12 g L^{-1} de sais biliares bovinos (Sigma[®]), preparada em NaHCO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, sendo o pH ajustado para 5,0 com a adição da solução de enzimas pancreatina e bile ($0,25 \text{ mL mL}^{-1}$) e permanecendo por 20 minutos a 45 rpm, ao final, era retirado o segundo erlenmeyer que correspondia a etapa do duodeno e também submetido imediatamente as análises de contagem de células probióticas viáveis.

A etapa referente ao íleo foi realizada por um aumento do pH para 6,5, utilizando uma solução de NaHCO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, permanecendo por 90 minutos em rotação de 45 rpm, e ao final era submetido as análises para contagem de células probióticas viáveis.

Todas as soluções foram preparadas imediatamente no momento da utilização e esterilizadas com membrana de poro $0,22 \mu\text{m}$ (Minisart, Sartorius Stedim Biotech, Alemanha), as enzimas eram armazenadas em temperaturas de $-18 \text{ }^\circ\text{C}$.

A análise foi conduzida em uma incubadora refrigerada tipo Shaker (TE-421, Tecnal, Brasil) mantida a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, com o intuito de simular a temperatura do corpo humano e a agitação

mecânica foi utilizada em paralelo para simular os movimentos peristálticos intestinais, com intensidades semelhantes às alcançadas na seção do trato digestivo. Ao final de cada etapa, foram retiradas alíquotas para a contagem das células probióticas viáveis, conforme descrito anteriormente.

Comportamento térmico

Para conhecer o comportamento térmico do *Lactobacillus acidophilus* encapsulado adicionado na manteiga, foram mantidas as amostras em três condições de temperatura: (1) temperatura ambiente de 25 ± 5 °C, (2) temperatura de congelamento de -18 ± 2 °C e (3) submetidos a temperaturas de 50, 75 e 100 °C. Na condição 1, as amostras foram analisadas no tempo zero e a cada sete dias; já na condição 2, as amostras foram analisadas a cada 30 dias até 180 dias.

A análise da viabilidade probiótica em temperaturas de aquecimento foi realizada a partir de 1 g de amostra, adicionadas em tubos contendo 10 mL de água destilada. Os tubos foram submetidos a banho-maria por 15 minutos nas temperaturas de 50, 75 e 100 °C, conforme proposto por Sabikhi et al. (2010). Para determinação das células probióticas viáveis, durante e após o teste de temperatura, foi seguido procedimento citado anteriormente.

Composição físico-química

As amostras de manteiga foram submetidas às análises físico-químicas para determinação do teor de gordura, umidade, extrato seco desengordurado (ESD) e acidez, conforme as exigências da Portaria nº 146, de 07 de março de 1996 (Brasil, 1996) e da Resolução nº 04, de 28 de junho de 2000 (Brasil, 2000), e para complementação da caracterização das amostras, foi realizada a determinação dos teores de proteína, cinzas e cloretos. Todas as análises físico-químicas foram realizadas em triplicatas, seguindo as metodologias recomendadas pela *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC, 2005, Volume II): Gordura - 938.06, Proteínas - 981.10 (micro-Kjeldahl), Cinzas - 920.117, Umidade 920.116, Cloretos – Potenciometria (determinação do cloreto, expressa em cloreto de sódio) 971.27, Índice de peróxidos – 965.33. Para acidez seguiu-se a metodologia ISO 660 - AOCS Cd 3d-63, e para extrato seco desengordurado (ESD) seguiu-se a metodologia ISO 3727-2 do *International Dairy Federation* IDF 80-2 Gravimetry. A análise de atividade de água foi medida diretamente nas amostras, através do analisador de atividade de água da

marca AquaLab, modelo 4TEV, à temperatura constante (25 °C). As análises exigidas pela legislação brasileira, foram realizadas no tempo zero (dia da fabricação) e a cada 15 dias, até 60 dias de armazenamento. As demais análises foram realizadas no tempo zero e no dia 60 de armazenamento.

Foi realizada análise de cor na superfície das manteigas refrigeradas (5 °C), em sextuplicata, de acordo com o sistema da *Commission Internationale de L'Éclairage* – CIE, utilizando as coordenadas L*, a* e b*, através de um colorímetro Minolta® (modelo CM-700d, Konica Minolta, Osaca, Japão), com iluminante A, ângulo de 10°, medição por reflectância incluso (SCI), com área de medição de 8 mm (máscara com placa, MAV). Os resultados foram expressos como L* (luminosidade), a* (onde -a* representa direção ao verde e +a* direção ao vermelho) e b* (onde -b* representa direção ao azul e +b* direção ao amarelo).

A determinação do perfil dos ácidos graxos das amostras de manteigas foi realizada em triplicatas e seguiu as recomendações propostas por Hara e Radin (1978) para a extração dos lipídios, sendo as amostras secas em bomba a vácuo e após armazenadas sob congelamento (-20 °C) até seguirem para a etapa de metilação e determinação do perfil lipídico. A metilação, que consiste do processo de esterificação dos ácidos graxos, seguiu a metodologia proposta por Christie (1982), e após, as amostras foram submetidas à análise cromatográfica.

A análise cromatográfica foi realizada através da utilização de um cromatógrafo a gás Agilent Technologies, série 6890N, equipado com detector de ionização de chama (FID), injetor Split e coluna capilar de sílica fundida, com as dimensões de 60 m de comprimento, 0,25 mm diâmetro interno e 0,2 µm de espessura do filme. O nitrogênio foi utilizado como gás de arraste. O volume de amostra injetada foi de 1 µL. Os ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção de padrões de referência. O padrão interno adicionado foi o tricosanoato de metila (23:0 Me). A quantificação dos ácidos graxos foi determinada de acordo com Visentainer (2012).

Análise de textura

A metodologia utilizada para as análises de textura da manteiga foi baseada em Figueiroa et al. (2013) e Brandão et al. (2015). A análise ocorreu por meio de um *probe* cilíndrico metálico de 6 mm em um analisador de textura *TAXT plus Texture Analyser* (Stable Micro Systems, London, UK). O teste realizado foi de compressão, no qual o *probe* penetrou

uma distância de 12 mm a partir da superfície da amostra, com velocidade pré-teste de 1 mm/seg., velocidade de teste de 2 mm/seg. e pós teste de 2 mm/seg. Os parâmetros de textura avaliados foram a força de penetração aplicada sobre a amostra reportada como a firmeza da manteiga, a energia de penetração da sonda e a força negativa aplicada para a retirada da sonda chamada de resistência a sonda, todos expressos em Newtons. As amostras foram analisadas em temperatura controlada de 10 °C e análises foram realizadas em decuplicatas.

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise térmica foi realizada utilizando calorimetria diferencial de varredura (DSC-60Plus Shimadzu) (Luccas; Kieckbusch, 2006; Tomaszewska-Gras, 2016). Cadinhos selados de alumínio foram utilizados para armazenar tanto a referência (cadinho vazio contendo apenas ar) quanto as amostras de manteiga. No cadinho de amostra foram inseridos 3 ± 1 mg de manteiga. Amostras de manteiga foram aquecidas da temperatura ambiente até 100 °C, a fim de observar a fusão ocorrida com o aquecimento. O sistema foi alimentado com nitrogênio gasoso a uma vazão de 50 mL/min e o aquecimento se deu a uma taxa de 2 °C/min. Os resultados foram registrados no *software* TA-60WS *Collection Monitor* (Shimadzu) e analisados no *software* TA60 (Shimadzu).

Análise sensorial

A análise sensorial teve por objetivo avaliar a aceitação das manteigas probióticas por parte dos consumidores. Foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial da Universidade Franciscana. Os provadores assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), concordando em participar da pesquisa. O estudo está registrado e aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria, sob número de registro CAAE 56769116.9.0000.5346.

As manteigas foram submetidas aos testes afetivo de aceitação e de intenção de compra. As amostras foram oferecidas aos provadores para avaliação em relação aos atributos de cor, aroma, sabor, textura e aparência global, utilizando escala hedônica estruturada verbal, bipolar de sete pontos (1 = desgostei muitíssimo, 2 = desgostei muito, 3 = desgostei, 4 = indiferente, 5 = gostei, 6 = gostei muito e 7 = gostei muitíssimo) conforme Lawless e Heymann (2010). Para intenção de compra foi utilizada uma escala de cinco pontos (1 = certamente não compraria, 2 = provavelmente não compraria, 3 = talvez sim/ talvez não, 4 =

provavelmente compraria e 5 = certamente compraria). As amostras foram servidas em temperatura adequada e mantendo-se a 12 °C durante a análise, juntamente com água e bolacha água e sal, e codificadas com algarismos de três dígitos aleatórios (IAL, 2008).

Análise estatística

Os dados obtidos em planilhas do Microsoft Excel®, foram analisados conforme delineamento inteiramente casualizado, aplicando análise descritiva, análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias, em um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). O programa estatístico utilizado foi o SPSS® versão 15.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vida de prateleira e viabilidade probiótica

A viabilidade inicial do microrganismo livre, encapsulado e dos tratamentos da manteiga está demonstrado na Tabela 2. A manteiga padrão (T1) não possui adição de microrganismos probióticos. O tratamento com *Lactobacillus acidophilus* livre ativado (T2) apresentou baixa concentração probiótica desde o dia da fabricação, mostrando que a adição do microrganismo livre na manteiga não foi favorável. Os tratamentos com probiótico encapsulado (T3, T4, T5 e T6) mostraram resultados satisfatórios até o dia 45 de armazenamento das manteigas.

Alguns fatores podem afetar a sobrevivência dos probióticos, como o conteúdo de gordura, o tipo e a concentração de proteínas, açúcares e pH (Ranadheera; Baines; Adams, 2010), sendo que a técnica de encapsulação pode contribuir para aumentar a viabilidade dos microrganismos quando adicionados em alimentos com essas características, como a manteiga.

Erkaya et al. (2015) desenvolveram manteigas com adição de bactérias probióticas (*L. acidophilus* e *B. bifidum*) livres e mostraram que a viabilidade probiótica não ultrapassou 30 dias de armazenamento, e também apresentou valores inferiores para contagem de células bacterianas probióticas em relação ao encontrado nas amostras de manteiga com microrganismo encapsulado. A contagem de células viáveis probióticas do estudo citado, não atingiu 7 log UFC g⁻¹.

Tabela 2 – Resultado da viabilidade do *L. acidophilus* encapsulado (1%) e da manteiga adicionada das cápsulas. Resultados expressos em log UFC g⁻¹.

	0	15	30	45	60
<i>L. acidophilus</i> livre	10,63±0,16 ^a	-	-	-	-
<i>L. acidophilus</i> encapsulado	10,65±0,22 ^{aA}	9,82±0,10 ^{aB}	8,95±0,21 ^{aC}	8,91±0,11 ^{aC}	8,90±0,13 ^{aC}
T1	-	-	-	-	-
T2	6,88±0,13 ^{dA}	6,44±0,18 ^{dB}	6,04±0,19 ^{cB}	6,00±0,10 ^{cB}	5,82±0,12 ^{dC}
T3	8,94±0,17 ^{cA}	8,90±0,15 ^{cA}	8,71±0,13 ^{bA}	8,45±0,13 ^{bB}	7,41±0,13 ^{bcC}
T4	8,85±0,16 ^{cA}	8,76±0,10 ^{cA}	8,60±0,16 ^{bA}	8,26±0,11 ^{bB}	7,00±0,14 ^{cC}
T5	9,99±0,11 ^{bA}	9,79±0,09 ^{bA}	8,98±0,15 ^{aB}	8,91±0,10 ^{aB}	7,91±0,10 ^{bC}
T6	9,95±0,10 ^{bA}	9,77±0,12 ^{bA}	9,00±0,14 ^{aB}	8,98±0,16 ^{aB}	7,96±0,10 ^{bC}

Médias obtidas das três repetições da experimentação, todas realizadas em triplicatas, seguidas ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Legenda: T1 – tratamento padrão. T2 – 1% cultura probiótica livre. T3 – 5% partículas probióticas, 1% sal hipossódico. T4 – 5% partículas probióticas, 0,5% sal hipossódico. T5 – 10% partículas probióticas, 0,5% sal hipossódico. T6 – 10% partículas probióticas, 1% sal hipossódico.

Fonte: Autora.

Durante a vida de prateleira das amostras e das cápsulas probióticas, demonstrado na Tabela 3, obteve-se resultados negativos para *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, coliformes termotolerantes e *Salmonella*. Houve crescimento de bolores e leveduras no 60º dia de armazenamento, tanto para as cápsulas, quanto para os tratamentos de manteiga que possuíam as cápsulas probióticas. Portanto, a vida de prateleira das manteigas produzidas é de 45 dias.

Tabela 3 – Resultados das análises microbiológicas durante o tempo de armazenamento das amostras de manteigas e cápsula com *L. acidophilus*. Resultados expressos em UFC/g.

		Dias de armazenamento				
		0	15	30	45	60
Bolores e leveduras	Cápsula					5,0x10 ⁷
	T1					<1,0x10
	T2					<1,0x10
	T3	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	4,0x10 ⁴
	T4					1,0x10 ⁵
	T5					3,0x10 ⁵
	T6					5,0x10 ⁵

Médias obtidas das três repetições da experimentação, todas realizadas em triplicatas.

Legenda: T1 – tratamento padrão. T2 – 1% cultura probiótica livre. T3 – 5% partículas probióticas, 1% sal hipossódico. T4 – 5% partículas probióticas, 0,5% sal hipossódico. T5 – 10% partículas probióticas, 0,5% sal hipossódico. T6 – 10% partículas probióticas, 1% sal hipossódico.

Fonte: Autora.

Teste *in vitro* da sobrevivência dos probióticos às condições gastrointestinais simuladas

O objetivo de encapsular os probióticos é para que eles possam chegar viáveis ao intestino, onde irão colonizar a microbiota intestinal e atuar como protetores. Porém, durante o processo digestivo existem condições adversas, como pH ácido do fluido gástrico e a presença de enzimas e sais biliares (Cook et al., 2012; Fávaro-Trindade; Heinemann; Pedroso, 2011).

O teste *in vitro*, apresentado na Tabela 4, mostrou que as cápsulas suportaram e protegeram o microrganismo durante a passagem pelo esôfago e estômago, havendo rompimento das cápsulas no duodeno e íleo. O *Lactobacillus acidophilus* livre e encapsulado mostrou viabilidade semelhante em sua contagem inicial (antes de ser submetido à simulação gastrointestinal) e durante a passagem pelo duodeno e íleo. Os tratamentos que possuem 5% de cápsulas probióticas (T3 e T4) apresentaram uma viabilidade inferior, chegando a 7 log UFC g⁻¹. Entretanto, os tratamentos com 10% de cápsulas (T5 e T6), apresentaram resultados positivos na simulação gastrointestinal.

Inúmeros estudos mostram resultados satisfatórios quanto a encapsulação de bactérias probióticas como *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. bifidum* encapsulados e submetidos a testes de simulação gastrointestinal (Fritzen-Freire et al., 2013; Liu et al., 2016; Yonekura et al., 2014; Holkem et al., 2016). Entretanto, ainda são poucos os estudos que avaliam a adição das cápsulas probióticas em alimentos, principalmente de cápsulas úmidas. Silva et al. (2017) avaliaram a adição de *L. acidophilus* e *B. bifidum* encapsulados e liofilizados adicionados em chocolate e observaram uma viabilidade satisfatória, acima de 6 log UFC g⁻¹, por 120 dias de armazenamento a 25 °C. Cavalheiro (2016) produziu cápsulas probióticas úmidas com *L. plantarum* e *E. faecium* e adicionou em produto cárneo, obtendo viabilidade acima de 6 log UFC g⁻¹ por até 70 dias de armazenamento a 5 °C.

Tabela 4 – Resultado do teste *in vitro* da sobrevivência dos probióticos às condições gastrointestinais simuladas. Resultados expressos em log UFC g⁻¹.

	Inicial	Estômago	Duodeno	Íleo
	(log UFC g ⁻¹)	(log UFC g ⁻¹)	(log UFC g ⁻¹)	(log UFC g ⁻¹)
<i>L. acidophilus</i> livre	8,94±0,17 ^{bA}	7,02±0,19 ^{aA}	6,56±0,13 ^{aA}	6,32±0,22 ^{aA}
<i>L. acidophilus</i> encapsulado	8,98±0,12 ^{aA}	4,97±0,15 ^{bC}	7,24±0,20 ^{bB}	7,21±0,18 ^{aA}
T1	-	-	-	-
T2	7,26±0,11 ^{cA}	2,90±0,10 ^{dC}	5,51±0,12 ^{dB}	5,45±0,14 ^{dB}
T3	9,34±0,09 ^{bA}	3,20±0,13 ^{cC}	7,73±0,15 ^{cB}	7,52±0,19 ^{dB}
T4	9,40±0,14 ^{bA}	3,00±0,09 ^{cD}	7,58±0,15 ^{cC}	8,04±0,10 ^{cB}
T5	9,90±0,12 ^{aA}	4,00±0,10 ^{cC}	8,85±0,08 ^{bB}	8,85±0,10 ^{bB}
T6	9,85±0,12 ^{aA}	2,00±0,11 ^{dC}	8,86±0,10 ^{bB}	8,79±0,13 ^{bB}

Médias obtidas das três repetições da experimentação, todas realizadas em triplicatas, seguidas ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Legenda: T1 – tratamento padrão. T2 – 1% cultura probiótica livre. T3 – 5% partículas probióticas, 1% sal hipossódico. T4 – 5% partículas probióticas, 0,5% sal hipossódico. T5 – 10% partículas probióticas, 0,5% sal hipossódico. T6 – 10% partículas probióticas, 1% sal hipossódico.

Fonte: Autora.

As cápsulas formadas pela técnica de extrusão possuem o núcleo totalmente disperso na matriz encapsulante, podendo apresentar uma parte do material encapsulado na superfície da matriz, o que explica a contagem de células viáveis na fase do estômago. Além disso, a forma de liberação do recheio pode ser parcial ou total e diferentes mecanismos podem ativar essa liberação, como pH, ação enzimática, osmolaridade, temperatura, ruptura mecânica, dentre outros (Maestrelli et al., 2008). Para as cápsulas de alginato é necessário um pH neutro-alcálico para que ocorra a desestabilização da cápsula e consequente liberação do material encapsulado, os probióticos (Martín et al., 2015; Holkem et al., 2016, Shori, 2017). Isso explica o motivo da liberação dos microrganismos iniciar na fase do duodeno, podendo aumentar a concentração de células viáveis até a chegada no íleo.

Compostos presentes no fluido intestinal simulado podem ocasionar a redução da viabilidade dos probióticos livres e encapsulados, como os sais biliares que apresentam atividade antimicrobiana (Madureira et al., 2011), por esse motivo também pode ocorrer diminuição da viabilidade dos probióticos na passagem do duodeno até o a chegada no íleo.

Silva et al. (2012) relatou que células probióticas livres, sem estarem encapsuladas, adicionadas em produto lácteo, tiveram redução de 11 log UFC g⁻¹ para 6 log UFC g⁻¹ após serem submetidas as condições gastrointestinais *in vitro*. Apesar da redução no produto de 5 log UFC g⁻¹, ainda foi considerado que o probiótico apresentou viabilidade para consumo.

Em estudo que submeteu microcápsulas de alginato de sódio com *L. acidophilus* às mesmas condições gastrointestinais, as partículas se comportaram de modo semelhante a esse estudo, mostrando que no pH do estômago as cápsulas protegem o microrganismo, porém houve redução na concentração probiótica, diminuindo em média 2 log UFC g⁻¹ da contagem inicial até ao final da simulação gastrointestinal (Etchepare, 2014; Etchepare, 2017). Neste estudo houve redução média de 1 log UFC g⁻¹, provavelmente, essa diferença está relacionada ao tamanho da cápsula, mostrando melhor eficiência para cápsulas maiores.

Comportamento térmico

Na Figura 2 é possível verificar que o *Lactobacillus acidophilus* encapsulado quando submetido ao tratamento térmico de 50, 75 e 100 °C, sobrevive à temperatura de 50 °C, entretanto, na temperatura de 75 °C não possui mais potencial probiótico, e quando submetido à temperatura de 100 °C, há rompimento das cápsulas e inviabilidade total do microrganismo. Segundo Kim et al. (2001), a temperatura letal de *Lactobacillus acidophilus* é 60 °C, o que

mostra que a cápsula protegeu uma parcela de microrganismos, ainda restando células viáveis após a exposição a temperatura de 75 °C.

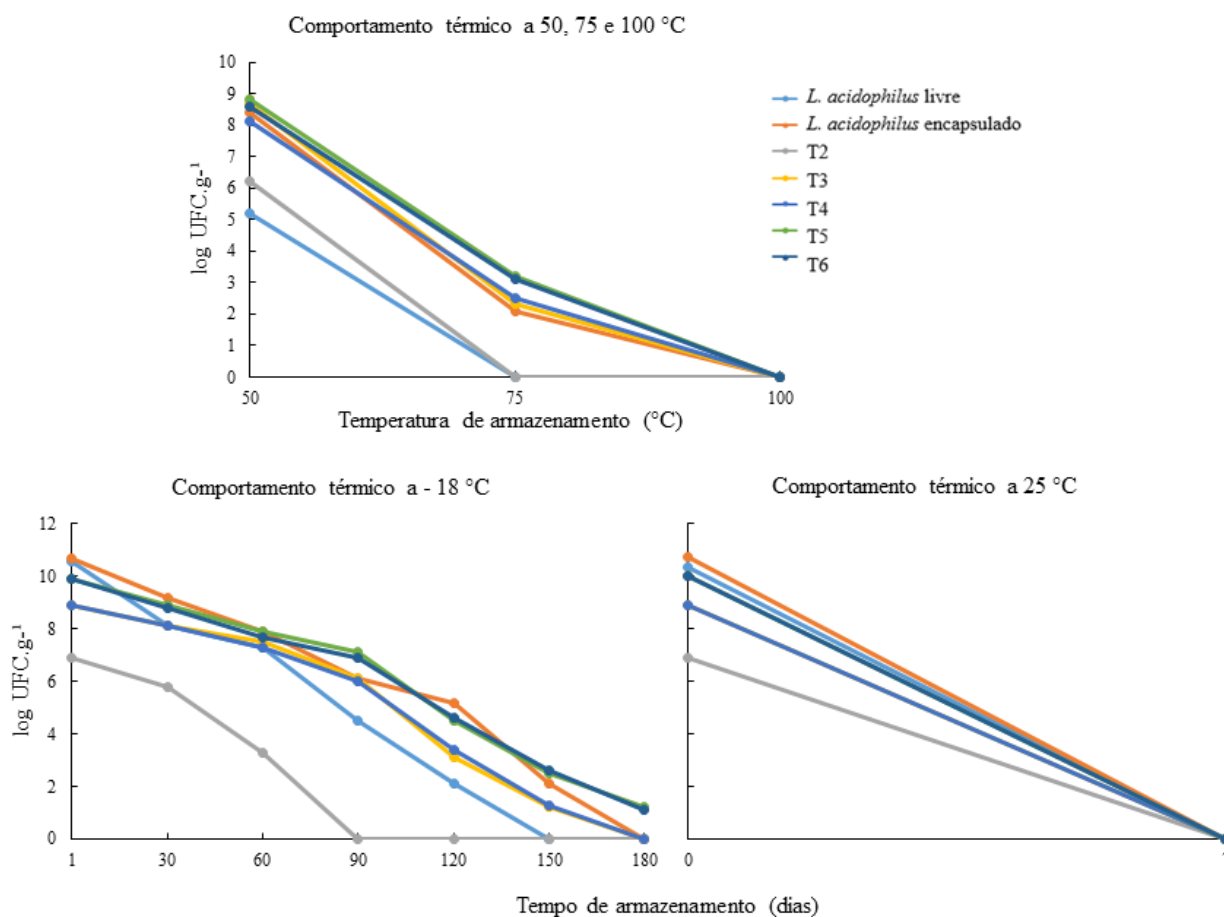


Figura 2 – Resultado do teste de viabilidade probióticas das manteigas durante análise de comportamento térmico. Resultados expressos em log UFC.g⁻¹.

Fonte: Autora.

Quando submetidos a -18 °C (Figura 2), o *L. acidophilus* encapsulado e as manteigas com cápsulas probióticas chegam a 90 dias de armazenamento apresentando uma viabilidade satisfatória, acima de 6 log UFC g⁻¹. Ao manter em temperatura ambiente (25±5 °C), os microrganismos encapsulados e aplicados na manteiga não sobrevivem. Ao ser submetido ao comportamento térmico de 50, 75 e 100 °C, por 15 minutos em cada temperatura, pode-se perceber que a cápsula protege o microrganismo na temperatura de 50 °C, porém há uma diminuição de sua viabilidade. Ao ser submetido a 75 °C, a cápsula ainda consegue proteger os microrganismos, porém apresenta uma contagem média de 2 log UFC g⁻¹, o que é considerado insatisfatório de acordo com Ying, Sun, Sanguansri, Weerakkody e Augustin

(2012). Ao ser submetido a temperatura de 100 °C, nenhum microrganismo sobrevive e ocorre a desestruturação total das cápsulas.

Através do comportamento térmico, é possível concluir que a cápsula proporciona uma vida de prateleira melhor ao microrganismo quando congelado e em temperatura de refrigeração, conforme mostrado nos resultados. Entretanto, as cápsulas quando submetidas ao descongelamento, que ocorreu em refrigeração (5 °C), apresentaram alterações físicas, como rompimento da estrutura, sugerindo diminuição das células viáveis no restante do período de estocagem em refrigeração. Nas amostras de manteiga após o descongelamento, houve alteração nas características organolépticas da manteiga, por perda de água, e também nas cápsulas, conforme descrito, o que leva a considerar que o produto mantido a -18 ± 2 °C não será bem aceito após o processo de descongelamento. Essas alterações que ocorreram no produto são explicadas pelo fato de que durante o congelamento se formaram cristais de gelo, que ocasionaram na ruptura das membranas celulares devido aos cristais formados no espaço intercelular, além da injúria celular ocasionada pelo aumento da pressão osmótica. Esse fato traz, em consequência, forte exsudação no descongelamento, com perda de água e elementos nutritivos (Colla; Prentice-Hernández, 2003).

Composição físico-química

Os resultados das análises físico-químicas (Tabela 5) mostram diferenças entre as amostras que continham cápsulas e as que não possuíam, em relação aos teores de proteínas, cinzas e cloretos. Com relação a atividade de água, amostras da mesma formulação tiveram diferença significativa entre o tempo zero (dia da fabricação) e o tempo 60, provavelmente esta diferença seja resultado da liberação de água das cápsulas (Cavalheiro, 2016), que fica livre na manteiga.

O teor de cloretos de sódio analisado é considerado baixo, mostrando que o sal hipossódico, reduzido em 50% de sódio, está de acordo com o estabelecido na rotulagem, pois possui em 1 g, em média, 500 mg de cloreto de sódio e 500 mg de cloreto de potássio, visto que a análise utilizada determina o teor de cloreto de sódio. É possível observar que o valor encontrado se refere a metade (média) do valor aplicado no alimento. O sal hipossódico deve conter no máximo 50% do teor de sódio contido na mesma quantidade de cloreto de sódio (Brasil, 1995). Um objetivo com o desenvolvimento da manteiga probiótica e hipossódica, é conseguir diminuir o sal e manter um sabor agradável para atender ao gosto do consumidor,

sendo este um objetivo considerado desafiador, porém, possível de alcançar com a aplicação de sal hipossódico, de acordo com Zandstra, Lion e Newson (2016).

As cápsulas apresentam alto teor de umidade, motivo pelo qual leva a deterioração da manteiga mais rapidamente. Como pode-se observar nos resultados, os tratamentos que contém cápsulas (T3, T4, T5 e T6) deterioraram concomitantemente, entretanto, as amostras que não possuem cápsulas, não apresentaram crescimento de bolores. A atividade de água (Aa) é um critério vital, pois é indicativo da estabilidade de armazenamento de alimentos, elevados teores de Aa promovem o crescimento microbiano (Findik; Andiç, 2017).

Tabela 5 – Resultado dos teores de proteína, cinzas, cloretos e atividade de água no tempo zero (fabricação) e ao final da vida de prateleira das formulações de manteiga.

Parâmetros		Dias de armazenamento	
		0	60
Proteína (%)	T1	1,25±0,03 ^{cA}	1,29±0,01 ^{cA}
	T2	1,24±0,04 ^{cA}	1,27±0,05 ^{cA}
	T3	1,37±0,05 ^{bA}	1,41±0,06 ^{bA}
	T4	1,42±0,04 ^{bA}	1,46±0,04 ^{bA}
	T5	1,55±0,03 ^{aA}	1,57±0,02 ^{aA}
	T6	1,55±0,01 ^{aA}	1,57±0,02 ^{aA}
Cinzas (%)	T1	0,22±0,03 ^{dA}	0,22±0,03 ^{dA}
	T2	0,23±0,01 ^{dA}	0,23±0,02 ^{dA}
	T3	0,50±0,00 ^{bA}	0,50±0,01 ^{cA}
	T4	0,44±0,01 ^{cA}	0,48±0,02 ^{cA}
	T5	0,57±0,02 ^{aA}	0,55±0,02 ^{bA}
	T6	0,57±0,01 ^{aB}	0,64±0,01 ^{aA}
Cloretos (%)	T1	0,03±0,00 ^{cA}	0,04±0,00 ^{cA}
	T2	0,03±0,00 ^{cA}	0,03±0,00 ^{cA}
	T3	0,52±0,01 ^{aA}	0,52±0,01 ^{aA}
	T4	0,33±0,00 ^{bA}	0,33±0,00 ^{bA}
	T5	0,29±0,03 ^{bA}	0,30±0,02 ^{bA}
	T6	0,54±0,03 ^{aA}	0,55±0,03 ^{aA}
Aa	T1	0,92±0,01 ^{bcA}	0,95±0,01 ^{cA}
	T2	0,92±0,01 ^{cA}	0,96±0,01 ^{bcA}
	T3	0,95±0,01 ^{aB}	0,97±0,01 ^{abcA}
	T4	0,94±0,01 ^{abB}	0,97±0,01 ^{abcA}
	T5	0,96±0,01 ^{aB}	0,98±0,00 ^{aA}
	T6	0,96±0,01 ^{aA}	0,98±0,00 ^{abA}

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

Legenda: T1 – tratamento padrão. T2 – 1% cultura probiótica livre. T3 – 5% partículas probióticas, 1% sal hipossódico. T4 – 5% partículas probióticas, 0,5% sal hipossódico. T5 – 10% partículas probióticas, 0,5% sal hipossódico. T6 – 10% partículas probióticas, 1% sal hipossódico.

Fonte: Autora.

A Tabela 6 apresenta os resultados das análises físico-químicas exigidas pela legislação brasileira para manteiga (Brasil, 1996). A única amostra que apresentou teores inferiores ao exigido para gordura, que é 80% para manteigas salgadas (Brasil, 1996), foi o T6. Os tratamentos T5 e T6 apresentaram valores acima para umidade, o que era esperado, visto a adição de 10% das cápsulas úmidas nas formulações. Todas as amostras apresentaram valores dentro do estabelecido para acidez e índice de peróxidos. Entretanto, apenas a amostra T5 apresentou valores adequados para extrato seco desengordurado (ESD) durante todo período de armazenamento. Pode-se constatar que as amostras, de modo geral, não apresentam diferenças significativas entre os períodos de análises, com exceção da acidez, que apresentou diferença em todos os períodos (0, 15, 30, 45 e 60).

Os valores de acidez aumentaram significativamente durante o armazenamento, atingindo valores entre 1,72 a 2,75 mmol/100g no final do período de estocagem. Esse resultado indica que houve hidrólise enzimática da gordura (lipólise), que provocou o aumento de ácidos graxos livres e consequente aumento da acidez no período de armazenamento. O mesmo ocorreu com os valores de peróxido, que indicam oxidação lipídica, aumentaram significativamente durante o período de armazenamento. Os valores iniciais de peróxidos observados (0,31 a 0,37 meq/kg) se assemelham aos encontrados por outros autores também no tempo zero da fabricação de manteigas (Samet- Bali et al., 2009; Senel et al., 2011). Os valores de acidez e peróxidos, durante toda a vida de prateleira das manteigas, se mantiveram dentro dos parâmetros de qualidade estabelecidos pela legislação brasileira (Brasil, 1996).

Erkaya et al. (2015) mostraram que manteigas elaboradas com bactérias probióticas, na Turquia, armazenadas por 60 dias, tiveram valores para acidez, que variaram de 0,35 a 0,39 mmol/100 g na formulação padrão, e valores que variaram de 0,36 a 0,39 mmol/100 g nas manteigas com *B. bifidum* e na formulação com *L. acidophilus* os valores encontrados foram 0,36 a 0,42 mmol/100 g. Valores de 0,70 a 1,05 mmol/100 g foram encontrados no estudo de Méndez-Cid et al. (2017), indo de encontro ao estabelecido pela legislação brasileira, já Fernandes et al. (2012), avaliaram oito marcas de manteigas comerciais e encontraram valores de acidez de 0,84 a 4,54 mmol/100 g, sendo este último acima ao que preconiza a legislação brasileira, de acidez máxima igual a 3 mmol/100 g.

Ledoux et al. (2005) elaboraram manteigas com matéria prima de diversas regiões da França e encontraram um teor médio de gordura de 83,6%. Méndez-Cid et al. (2017) em um estudo também realizado na França, encontraram um teor médio de 92,0% de gordura para a manteiga sem sal. Valores semelhantes foram encontrados nesse estudo, entre 80,82 a 84,39%.

Tabela 6 – Resultado para o teor de gordura, umidade, índice de peróxidos, acidez na gordura e extrato seco desengordurado (ESD) das manteigas no armazenamento (60 dias).

Parâmetros		Dias de armazenamento				
		0	15	30	45	60
Gordura (%)	T1	84,09±0,56 ^{aA}	84,01±0,77 ^{aA}	84,10±0,98 ^{aA}	83,94±0,73 ^{aA}	83,89±0,77 ^{aA}
	T2	84,39±0,53 ^{aA}	84,34±0,50 ^{aA}	84,23±0,67 ^{aA}	84,06±0,77 ^{aA}	83,97±0,69 ^{aA}
	T3	81,11±1,25 ^{bA}	81,01±1,09 ^{bcA}	81,10±1,07 ^{bcA}	80,87±0,86 ^{bcA}	80,82±0,89 ^{bcA}
	T4	81,73±0,10 ^{bA}	81,57±0,27 ^{bA}	81,62±0,23 ^{bA}	81,56±0,29 ^{bA}	81,49±0,18 ^{bA}
	T5	81,14±0,21 ^{bA}	81,21±0,29 ^{bcA}	81,19±0,37 ^{bcA}	81,28±0,35 ^{bcA}	81,22±0,39 ^{bcA}
	T6	80,22±0,35 ^{bA}	79,73±0,65 ^{cA}	79,46±0,50 ^{cA}	79,75±0,36 ^{cA}	79,71±0,42 ^{cA}
Umidade (%)	T1	12,40±0,40 ^{dA}	12,14±0,47 ^{dA}	11,92±0,68 ^{dA}	11,84±0,59 ^{cA}	11,77±0,53 ^{cA}
	T2	12,88±0,14 ^{dA}	12,76±0,23 ^{dA}	12,62±0,37 ^{dA}	12,57±0,44 ^{cA}	12,43±0,51 ^{cA}
	T3	15,89±0,16 ^{cA}	15,76±0,24 ^{cA}	15,45±0,50 ^{cA}	15,53±0,67 ^{bA}	15,49±0,64 ^{bA}
	T4	15,89±0,31 ^{cA}	15,86±0,34 ^{cA}	15,65±0,54 ^{bcA}	15,47±0,57 ^{bA}	15,38±0,64 ^{bA}
	T5	17,25±0,28 ^{bA}	17,06±0,43 ^{bA}	16,96±0,31 ^{abA}	16,77±0,53 ^{abA}	16,79±0,55 ^{abA}
	T6	18,31±0,36 ^{aA}	18,24±0,48 ^{aA}	17,82±0,57 ^{aA}	17,81±0,60 ^{aA}	17,75±0,62 ^{aA}
Índice de peróxidos (meq/kg)	T1	0,31±0,01 ^{bE}	0,39±0,02 ^{aD}	0,58±0,04 ^{aC}	0,67±0,04 ^{aB}	0,82±0,01 ^{bA}
	T2	0,33±0,01 ^{abE}	0,38±0,01 ^{aD}	0,56±0,02 ^{aC}	0,62±0,03 ^{aB}	0,83±0,02 ^{bA}
	T3	0,35±0,02 ^{abd}	0,41±0,02 ^{aD}	0,59±0,04 ^{aC}	0,68±0,03 ^{aB}	0,96±0,02 ^{aA}
	T4	0,37±0,03 ^{abd}	0,42±0,03 ^{aD}	0,52±0,02 ^{aC}	0,64±0,03 ^{aB}	0,93±0,01 ^{aA}
	T5	0,34±0,02 ^{abd}	0,38±0,01 ^{aD}	0,58±0,02 ^{aC}	0,71±0,02 ^{aB}	0,92±0,03 ^{aA}
	T6	0,37±0,02 ^{aD}	0,41±0,02 ^{aD}	0,59±0,03 ^{aC}	0,71±0,05 ^{aB}	0,95±0,04 ^{aA}
Acidez (mmol/00g)	T1	0,66±0,01 ^{cC}	0,67±0,01 ^{dC}	0,71±0,03 ^{bC}	1,09±0,02 ^{cB}	1,72±0,04 ^{dA}
	T2	0,67±0,02 ^{cD}	1,94±0,01 ^{aC}	2,01±0,02 ^{aC}	2,24±0,07 ^{aB}	2,75±0,05 ^{aA}
	T3	0,86±0,03 ^{bD}	0,88±0,01 ^{cD}	0,95±0,01 ^{bC}	1,10±0,02 ^{cB}	1,51±0,04 ^{dA}
	T4	0,87±0,01 ^{bD}	0,89±0,00 ^{cD}	0,98±0,02 ^{bC}	1,15±0,05 ^{cB}	1,83±0,01 ^{cdA}
	T5	0,93±0,02 ^{aC}	0,95±0,02 ^{bC}	0,98±0,01 ^{bC}	1,63±0,05 ^{bb}	1,92±0,01 ^{cA}
	T6	0,94±0,01 ^{ab}	0,95±0,01 ^{bb}	1,33±0,05 ^{bb}	2,16±0,17 ^{aA}	2,41±0,08 ^{bA}
ESD (%)	T1	3,50±0,94 ^{aA}	3,85±1,23 ^{aA}	3,97±1,67 ^{aA}	4,22±1,32 ^{aA}	4,34±1,29 ^{aA}
	T2	2,73±0,53 ^{abA}	2,90±0,47 ^{abA}	3,15±1,04 ^{aA}	3,37±1,21 ^{aA}	3,60±1,13 ^{abA}
	T3	3,00±1,12 ^{abA}	3,22±0,85 ^{abA}	3,45±0,58 ^{aA}	3,60±0,19 ^{aA}	3,69±0,25 ^{abA}
	T4	2,38±0,22 ^{abA}	2,57±0,43 ^{abA}	2,72±0,44 ^{aA}	2,97±0,54 ^{aA}	3,13±0,53 ^{abA}
	T5	1,61±0,09 ^{bA}	1,73±0,22 ^{bA}	1,86±0,45 ^{aA}	1,96±0,55 ^{aA}	1,98±0,59 ^{bA}
	T6	1,47±0,02 ^{bA}	2,03±0,73 ^{abA}	2,72±0,22 ^{aA}	2,45±0,57 ^{aA}	2,54±0,62 ^{abA}

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

Legenda: T1 – tratamento padrão. T2 – 1% cultura probiótica livre. T3 – 5% partículas probióticas, 1% sal hipossódico. T4 – 5% partículas probióticas, 0,5% sal hipossódico. T5 – 10% partículas probióticas, 0,5% sal hipossódico. T6 – 10% partículas probióticas, 1% sal hipossódico.

Referência Portaria 146/1996 (Brasil, 1996): gordura: mínimo 80% (com sal) e 82% (sem sal); umidade: máximo 16%; índice de peróxidos: máximo 1 meq/kg; acidez: máximo 3 mmol/100g; extrato seco desengordurado (ESD): máximo 2%; acidez: máximo 3 mmol/100g.

Fonte: Autora.

Barros et al. (2013), analisaram 16 amostras de manteiga, os teores de umidade encontrados variaram de 18,3 a 19,5%, valores acima do permitido pela legislação vigente

(Brasil, 1996) que estabelece o valor máximo de 16% de umidade para manteiga. Apesar dos teores de umidade estarem acima do permitido pela legislação, houve padronização entre os lotes, durante a produção das manteigas, pois os teores de umidade foram semelhantes entre si. Este é um aspecto positivo, demonstrando que, apesar do processo de produção da manteiga ter sido artesanal, o produto obtido foi similar em termos da umidade.

Erkaya et al. (2015) encontraram valores para o índice de peróxidos que variaram, na manteiga padrão de 0,00 (meq/kg) no tempo zero de fabricação e 0,37 meq/kg após 60 dias de armazenamento. Nas manteigas com *B. bifidum* os valores variaram de 0,00 a 0,31 meq/kg e na manteiga com *L. acidophilus* de 0,00 a 0,25 meq/kg.

Fernandes et al. (2012), analisaram manteigas comerciais com sal e encontraram teores de umidade de 14,06% a 27,51%, gordura entre 70,54% a 83,78%, cloretos de 0,02% a 0,22%, cinzas com valores entre 0,20% e 3,46% e acidez que variou entre 1,83 e 4,25 mmol/100 g, estando esse último valor acima do permitido pela legislação brasileira e dos resultados encontrados no presente estudo.

A Tabela 7 apresenta os resultados encontrados na análise de cor. A cor da manteiga é passível de variações sazonais, origem da gordura, bem como da alimentação dos animais (Fernandes et al., 2012). Poucas informações sobre a cor da manteiga estão disponíveis na literatura. Os valores encontrados nesse estudo para os parâmetros (L^* , a^* e b^*) estão dentro da faixa dos relatados por outros autores (Méndez-Cid et al. 2017; Samet-Bali et al. 2009), com valores negativos para a^* , valores positivos para b^* e valores próximos a 100 para o parâmetro L^* .

A cor determinada para as amostras de manteiga, mostrou diferença entre os tratamentos que possuem adição de cápsula e os que não possuem, ainda apresentou valores mais elevados para as coordenadas avaliadas a^* e b^* e diminuição de L^* no período final do armazenamento, corroborando com os resultados encontrados por Méndez-Cid et al. (2017), entretanto, Queirós, Grimaldi e Gigante (2016) encontraram valores para maiores para L^* e a^* e valores menores para b^* .

Quanto ao valor de L^* pode ser observado que não houve grandes variações no escurecimento, mas, os valores diminuíram significativamente em todos os tratamentos durante o tempo de armazenamento, promovendo um clareamento mais acentuado nas manteigas de acordo com o aumento do processo oxidativo. O valor de b^* positivo evidencia a cor amarelada da manteiga. A cor amarela natural da gordura do leite deve-se à presença de carotenóides, vitamina A e outros pigmentos (Kontkanen et al., 2011), além disso, a raça da

vaca também influencia na cor da manteiga e o leite de Jersey tem um conteúdo mais elevado de β -caroteno que o leite de outras raças (Buldo; Wiking, 2016).

Tabela 7 – Resultado das análises de cor dos tratamentos do tempo inicial (0 dias) e final (60 dias) de armazenamento.

Parâmetros de Cor	Tratamentos	Dias de armazenamento	
		0	60
<i>L*</i>	T1	86,80±0,31 ^{aA}	83,76±0,61 ^{aB}
	T2	86,73±0,28 ^{aA}	83,83±0,55 ^{aB}
	T3	86,59±0,23 ^{aA}	84,62±0,43 ^{bB}
	T4	86,51±0,81 ^{aA}	84,82±0,41 ^{bB}
	T5	86,88±0,21 ^{aA}	84,80±0,33 ^{bB}
	T6	86,45±0,17 ^{aA}	83,99±0,19 ^{bB}
<i>a*</i>	T1	- 8,98±0,09 ^{aB}	- 10,20±0,08 ^{aA}
	T2	- 8,46±0,11 ^{aB}	- 10,13±0,12 ^{aA}
	T3	- 6,97±0,09 ^{bB}	- 9,29±0,09 ^{bA}
	T4	- 7,07±0,10 ^{bB}	- 9,27±0,10 ^{bA}
	T5	- 7,21±0,15 ^{bB}	- 9,38±0,16 ^{bA}
	T6	- 7,34±0,04 ^{bB}	- 9,31±0,15 ^{bA}
<i>b*</i>	T1	49,10±0,52 ^{aA}	53,24±0,32 ^{aA}
	T2	49,17±0,47 ^{aA}	53,61±0,19 ^{aA}
	T3	46,98±0,28 ^{cB}	54,87±0,22 ^{bA}
	T4	46,87±0,17 ^{cB}	54,72±0,09 ^{bA}
	T5	45,01±0,20 ^{bB}	54,98±0,15 ^{bA}
	T6	44,08±0,22 ^{bB}	54,91±0,81 ^{bA}

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

Legenda: T1 – tratamento padrão. T2 – 1% cultura probiótica livre. T3 – 5% partículas probióticas, 1% sal hipossódico. T4 – 5% partículas probióticas, 0,5% sal hipossódico. T5 – 10% partículas probióticas, 0,5% sal hipossódico. T6 – 10% partículas probióticas, 1% sal hipossódico.

Fonte: Autora.

A composição dos ácidos graxos da gordura do leite pode variar de acordo com a raça do animal, a alimentação e pelas variações sazonais (Buldo; Wiking, 2016).

A Tabela 8 mostra os resultados encontrados para a composição de ácidos graxos dos seis tratamentos. O ácido graxo mais abundante encontrado em todos os tratamentos foi o ácido palmítico (C 16:0) seguido pelo ácido oleico (C18:1n-9) e pelo ácido esteárico (C18:0), e não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos.

Nos resultados encontrados por Erkaya et al. (2015) em seu estudo com manteiga adicionada de bactérias probióticas, foi constatada a redução no ácido oleico em relação ao

tratamento padrão, porém, ao longo do armazenamento o ácido oleico aumentou, e o mesmo ocorreu com os teores de CLA, não sendo observada diferenças significativas nesse estudo.

Os níveis de CLA variaram de 0,65 a 0,79 g 100 g⁻¹ nesse estudo e não apresentaram diferenças significativas no período de armazenamento. A adição das cápsulas probióticas não mostrou diferença significativa nos níveis de CLA das amostras de manteiga e a presença de sal não influenciou o perfil dos ácidos graxos.

O perfil de ácidos graxos encontrado é consistente com aqueles já relatados na literatura para manteiga de leite de vaca (Ledoux et al., 2005; Mallia et al., 2008; Méndez-Cid et al., 2017; Queirós; Grimaldi; Gigante, 2016).

Tabela 8 – Perfil de ácidos graxos (g.100 g⁻¹) das amostras de manteigas probióticas.

		T1	T2	T3	T4	T5	T6
C4:0	0	1,95±0,04 ^{aA}	2,21±0,05 ^{aA}	2,14±0,01 ^{aB}	1,99±0,02 ^{aB}	2,15±0,32 ^{aB}	2,10±0,11 ^{aB}
	60	2,13±0,03 ^{aA}	2,25±0,23 ^{aA}	2,39±0,05 ^{aA}	2,37±0,03 ^{aA}	2,55±0,25 ^{aA}	2,46±0,11 ^{aA}
C6:0	0	1,58±0,37 ^{aA}	1,69±0,14 ^{aA}	1,81±0,02 ^{aA}	1,69±0,28 ^{aA}	1,75±0,14 ^{aA}	1,74±0,36 ^{aA}
	60	1,63±0,28 ^{aA}	1,72±0,12 ^{aA}	1,59±0,07 ^{aB}	1,70±0,14 ^{aA}	1,66±0,15 ^{aA}	1,79±0,29 ^{aA}
C8:0	0	0,91±0,17 ^{aA}	0,98±0,03 ^{aA}	0,88±0,06 ^{aA}	0,88±0,03 ^{aA}	0,99±0,08 ^{aA}	0,96±0,20 ^{bA}
	60	0,93±0,17 ^{aA}	0,91±0,05 ^{aA}	0,93±0,01 ^{aA}	0,95±0,07 ^{aA}	0,94±0,08 ^{aA}	1,03±0,17 ^{aA}
C10:0	0	2,26±0,31 ^{aA}	2,26±0,14 ^{aA}	2,17±0,18 ^{aA}	2,29±0,23 ^{aA}	2,33±0,20 ^{aA}	2,28±0,48 ^{aA}
	60	2,19±0,32 ^{aA}	2,14±0,04 ^{aA}	2,22±0,03 ^{aA}	2,30±0,12 ^{aA}	2,17±0,19 ^{aA}	2,38±0,42 ^{aA}
C11:0	0	0,03±0,01 ^{aA}	0,02±0,01 ^{aA}	0,02±0,01 ^{aA}	0,02±0,01 ^{aA}	0,03±0,00 ^{aA}	0,03±0,01 ^{aA}
	60	0,03±0,01 ^{aA}	0,03±0,01 ^{aA}	0,03±0,01 ^{aA}	0,03±0,01 ^{aA}	0,03±0,00 ^{aA}	0,03±0,01 ^{aA}
C12:0	0	2,81±0,27 ^{aA}	2,84±0,16 ^{aA}	2,65±0,08 ^{aA}	2,87±0,07 ^{aA}	2,72±0,25 ^{aA}	2,77±0,60 ^{aA}
	60	2,76±0,25 ^{aA}	2,70±0,16 ^{aA}	2,47±0,05 ^{aB}	2,56±0,19 ^{aB}	2,52±0,22 ^{aB}	2,39±0,07 ^{bB}
C13:0	0	0,09±0,01 ^{aA}	0,09±0,01 ^{aA}	0,09±0,01 ^{aA}	0,09±0,01 ^{aA}	0,09±0,01 ^{aA}	0,09±0,02 ^{aA}
	60	0,09±0,01 ^{aA}	0,07±0,01 ^{aA}	0,08±0,01 ^{aA}	0,08±0,01 ^{aA}	0,08±0,01 ^{aA}	0,09±0,01 ^{aA}
C14:0	0	9,83±0,54 ^{bA}	10,46±0,19 ^{aA}	10,50±0,42 ^{aA}	10,38±0,14 ^{aA}	10,47±0,47 ^{aA}	9,83±2,28 ^{bA}
	60	9,91±0,56 ^{aA}	10,62±0,36 ^{aA}	9,73±0,33 ^{aB}	9,33±0,23 ^{aB}	9,40±1,23 ^{aB}	10,24±1,6 ^{aA}
C14:1	0	0,68±0,04 ^{aA}	0,69±0,02 ^{aA}	0,67±0,01 ^{aA}	0,71±0,01 ^{aA}	0,75±0,08 ^{aA}	0,62±0,13 ^{aA}
	60	0,68±0,04 ^{aA}	0,66±0,03 ^{aA}	0,64±0,03 ^{aA}	0,64±0,03 ^{aA}	0,62±0,06 ^{aB}	0,65±0,12 ^{aA}
C15:0	0	0,83±0,04 ^{aA}	0,82±0,01 ^{aA}	0,82±0,02 ^{aA}	0,72±0,04 ^{bA}	0,70±0,14 ^{bA}	0,75±0,16 ^{bB}
	60	0,82±0,04 ^{aA}	0,77±0,05 ^{aA}	0,77±0,05 ^{aA}	0,72±0,01 ^{aA}	0,69±0,09 ^{aA}	0,84±0,13 ^{aA}
C16:0	0	26,26±1,5 ^{bA}	26,47±0,4 ^{bA}	27,28±0,59 ^{bA}	27,00±0,11 ^{bA}	27,36±0,4 ^{bA}	29,52±0,2 ^{aA}
	60	26,43±1,48 ^{aA}	27,29±1,5 ^{aA}	25,73±2,1 ^{abA}	25,99±1,1 ^{abA}	24,49±2,6 ^{bA}	26,58±4,0 ^{aA}
C16:1	0	0,93±0,00 ^{aA}	0,93±0,02 ^{aA}	0,94±0,02 ^{aA}	0,93±0,01 ^{aA}	0,92±0,01 ^{aA}	0,81±0,17 ^{bA}
	60	0,93±0,00 ^{aA}	0,89±0,02 ^{aA}	0,81±0,09 ^{bA}	0,86±0,07 ^{aA}	0,82±0,09 ^{bB}	0,87±0,14 ^{aA}
C17:0	0	0,56±0,03 ^{aA}	0,54±0,01 ^{aA}	0,60±0,01 ^{aA}	0,72±0,01 ^{aA}	0,68±0,10 ^{aA}	0,53±0,11 ^{aA}
	60	0,56±0,03 ^{aA}	0,52±0,03 ^{aA}	0,52±0,03 ^{aB}	0,55±0,02 ^{aB}	0,52±0,05 ^{aB}	0,57±0,09 ^{aA}
C17:1	0	0,26±0,01 ^{bA}	0,31±0,02 ^{abA}	0,30±0,03 ^{abA}	0,27±0,02 ^{bA}	0,35±0,12 ^{aA}	0,23±0,05 ^{bA}
	60	0,25±0,02 ^{aA}	0,24±0,02 ^{aA}	0,23±0,03 ^{aA}	0,23±0,01 ^{aA}	0,23±0,03 ^{aA}	0,26±0,05 ^{aA}
C18:0	0	9,85±0,73 ^{aA}	10,24±0,11 ^{aA}	10,32±0,03 ^{aA}	10,33±0,06 ^{aA}	10,27±0,08 ^{aA}	10,87±0,5 ^{aA}
	60	10,03±0,81 ^{aA}	10,23±0,05 ^{aA}	10,12±0,15 ^{aA}	10,00±0,40 ^{aA}	9,30±1,04 ^{aB}	10,14±1,5 ^{aA}
C18:1n9 (<i>cis</i> - 9,12)	0	13,54±1,12 ^{aA}	14,24±0,11 ^{aA}	14,22±0,02 ^{aA}	14,36±0,27 ^{aA}	14,33±0,17 ^{aA}	14,83±0,6 ^{aA}
	60	13,65±1,12 ^{aA}	14,08±0,26 ^{aA}	14,42±0,26 ^{aA}	13,83±0,14 ^{aA}	12,85±1,45 ^{aB}	14,00±2,3 ^{aA}
C18:1n9 (<i>trans</i> - 9,12)	0	2,13±0,15 ^{aA}	2,11±0,09 ^{aA}	2,14±0,03 ^{aA}	2,14±0,04 ^{aA}	2,07±0,15 ^{aA}	1,96±0,45 ^{aA}
	60	2,11±0,14 ^{aA}	2,23±0,16 ^{aA}	1,94±0,05 ^{aA}	2,12±0,08 ^{aA}	1,97±0,17 ^{aA}	2,17±0,32 ^{aA}
C18:2n6 (<i>cis</i> - 9,12)	0	0,53±0,03 ^{aA}	0,53±0,02 ^{aA}	0,53±0,02 ^{aA}	0,57±0,01 ^{aA}	0,58±0,01 ^{aA}	0,44±0,10 ^{aA}
	60	0,54±0,03 ^{aA}	0,53±0,01 ^{aA}	0,52±0,01 ^{aA}	0,49±0,03 ^{aA}	0,46±0,01 ^{aA}	0,45±0,05 ^{aA}
C18:2n6 (<i>trans</i> -	0	0,28±0,10 ^{aA}	0,24±0,07 ^{aA}	0,26±0,05 ^{aA}	0,34±0,03 ^{aA}	0,37±0,09 ^{aA}	0,30±0,07 ^{aA}
	60	0,29±0,06 ^{aA}	0,23±0,04 ^{aA}	0,27±0,01 ^{aA}	0,26±0,05 ^{aA}	0,27±0,06 ^{aB}	0,36±0,09 ^{aA}

9,12)							
C18:3n3	0	0,35±0,02 ^{aA}	0,34±0,02 ^{aA}	0,30±0,02 ^{aA}	0,33±0,01 ^{aA}	0,31±0,05 ^{aA}	0,33±0,08 ^{aA}
	60	0,35±0,02 ^{aA}	0,34±0,04 ^{aA}	0,28±0,06 ^{aA}	0,26±0,01 ^{aA}	0,28±0,05 ^{aA}	0,34±0,05 ^{aA}
C20:0	0	0,15±0,02 ^{aA}	0,14±0,01 ^{aA}	0,16±0,01 ^{aA}	0,16±0,01 ^{aA}	0,23±0,07 ^{aA}	0,14±0,03 ^{aA}
	60	0,15±0,02 ^{aA}	0,15±0,01 ^{aA}	0,16±0,01 ^{aA}	0,15±0,02 ^{aA}	0,15±0,02 ^{aA}	0,16±0,02 ^{aA}
C20:1n9	0	0,14±0,02 ^{aA}	0,15±0,01 ^{aA}	0,14±0,02 ^{aA}	0,15±0,01 ^{aA}	0,14±0,01 ^{aA}	0,13±0,03 ^{aA}
	60	0,14±0,02 ^{aA}	0,14±0,02 ^{aA}	0,15±0,01 ^{aA}	0,12±0,02 ^{aA}	0,14±0,02 ^{aA}	0,14±0,02 ^{aA}
C20:2	0	0,01±0,00 ^{aA}	0,01±0,01 ^{aA}	0,02±0,01 ^{aA}	0,02±0,01 ^{aA}	0,02±0,00 ^{aA}	0,02±0,00 ^{aA}
	60	0,02±0,01 ^{aA}	0,02±0,01 ^{aA}	0,02±0,01 ^{aA}	0,02±0,01 ^{aA}	0,02±0,01 ^{aA}	0,02±0,01 ^{aA}
C20:3n3	0	0,06±0,01 ^{aA}	0,06±0,01 ^{aA}	0,04±0,01 ^{aA}	0,04±0,01 ^{aA}	0,05±0,02 ^{aA}	0,06±0,01 ^{aA}
	60	0,06±0,00 ^{aA}	0,05±0,01 ^{aA}	0,04±0,01 ^{aA}	0,03±0,01 ^{aA}	0,05±0,00 ^{aA}	0,06±0,00 ^{aA}
C20:4n6	0	0,01±0,00 ^{aA}	0,01±0,00 ^{aA}	0,01±0,00 ^{aA}	0,01±0,00 ^{aA}	0,02±0,01 ^{aA}	0,01±0,00 ^{aA}
	60	0,01±0,00 ^{aA}	0,01±0,00 ^{aA}	0,01±0,00 ^{aA}	0,01±0,00 ^{aA}	0,01±0,00 ^{aA}	0,01±0,00 ^{aA}
C20:5n3	0	0,04±0,01 ^{aA}	0,04±0,01 ^{aA}	0,05±0,01 ^{aA}	0,04±0,01 ^{aA}	0,04±0,01 ^{aA}	0,04±0,01 ^{aA}
	60	0,04±0,00 ^{aA}	0,05±0,01 ^{aA}	0,04±0,01 ^{aA}	0,04±0,00 ^{aA}	0,04±0,00 ^{aA}	0,05±0,01 ^{aA}
C22:0	0	0,08±0,01 ^{aA}	0,08±0,01 ^{aA}	0,08±0,01 ^{aA}	0,07±0,01 ^{aA}	0,08±0,01 ^{aA}	0,07±0,02 ^{aA}
	60	0,09±0,02 ^{aA}	0,08±0,01 ^{aA}	0,08±0,01 ^{aA}	0,08±0,01 ^{aA}	0,07±0,01 ^{aA}	0,08±0,01 ^{aA}
C24:0	0	0,07±0,01 ^{aA}	0,06±0,01 ^{aA}	0,06±0,01 ^{aA}	0,06±0,01 ^{aA}	0,07±0,01 ^{aA}	0,07±0,01 ^{aA}
	60	0,07±0,00 ^{aA}	0,07±0,01 ^{aA}	0,08±0,01 ^{aA}	0,07±0,01 ^{aA}	0,07±0,01 ^{aA}	0,07±0,01 ^{aA}
CLA	0	0,73±0,03 ^{aA}	0,75±0,01 ^{aA}	0,76±0,04 ^{aA}	0,73±0,03 ^{aA}	0,79±0,07 ^{aA}	0,77±0,04 ^{aA}
	60	0,65±0,02 ^{aB}	0,79±0,02 ^{aA}	0,75±0,05 ^{aA}	0,69±0,04 ^{aA}	0,69±0,06 ^{aB}	0,72±0,05 ^{aA}

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e minúscula na coluna (para cada parâmetro no tempo 0 e 60), não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Legenda: T1 – tratamento padrão. T2 – 1% cultura probiótica livre. T3 – 5% partículas probióticas, 1% sal hipossódico. T4 – 5% partículas probióticas, 0,5% sal hipossódico. T5 – 10% partículas probióticas, 0,5% sal hipossódico. T6 – 10% partículas probióticas, 1% sal hipossódico.

Fonte: Autora.

Análise de textura

A textura da manteiga é importante para manter controle do processo (Brandão et al., 2015) e verificar se houve diferença na firmeza, energia de penetração e adesividade do produto com a adição das cápsulas. As amostras apresentaram diferenças significativas quanto a firmeza, e também à energia de penetração entre os tratamentos, evidenciando que a adição das cápsulas modifica as propriedades de textura. A manteiga base para os seis tratamentos foi a mesma, ou seja, possui inicialmente o mesmo teor de gordura, conseqüentemente a adição das cápsulas foi o fator de diferença entre as amostras. Vale ressaltar que durante a análise, o *probe* pode ou não ter encontrado alguma cápsula no percurso, ou ainda, poucas ou muitas cápsulas, visto que as cápsulas estão espalhadas na manteiga, mas não igualmente em sua totalidade interna e externa.

Esse fato pode explicar o motivo da amostra T6, que continha 10% de cápsulas ter apresentado uma firmeza menor que a amostra T4, que continha 5%, mesmo que não houve diferença estatística significativa, os resultados encontrados nas decuplicatas mostram a variação que houve durante a análise. Também, pode explicar o porque da amostra T3 (5% de cápsulas) não apresentar diferença quando comparada com a T6 (10% de cápsulas), entretanto

ser diferente da amostra T5 (10% de cápsulas). Todas as amostras, quando analisadas a firmeza e a energia de penetração, que é a força necessária para a sonda penetrar a amostra, foram diferentes significativamente da amostra padrão (T1), apresentando características de maior firmeza e energia de penetração. Pelos resultados obtidos o teor de 0,5% e 1,0% de sal hipossódico não propiciou em alteração na textura durante a análise.

Os resultados mostram que a presença das cápsulas conferiu resultados de textura como uma manteiga mais firme e necessita maior força de penetração da sonda. A resistência a *probe*, que apresenta a adesividade, ou seja, a resistência da saída da sonda da amostra, não teve diferença significativa entre as amostras, mostrando que a adição das cápsulas na manteiga não interferiu nesse parâmetro.

Tabela 9 - Firmeza, energia de penetração e resistência ao *probe* em diferentes tratamentos de manteiga.

Tratamento	Firmeza (N)	Energia de penetração (N)	Resistência a sonda (N)
T1	2,16 ^c	8,49 ^b	- 3,35 ^a
T3	2,55 ^b	10,28 ^a	- 3,34 ^a
T4	2,79 ^{ab}	10,73 ^a	- 3,42 ^a
T5	3,00 ^a	10,45 ^a	- 3,61 ^a
T6	2,63 ^{ab}	10,86 ^a	- 3,39 ^a

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

Legenda: T1 – tratamento padrão. T3 – 5% partículas probióticas, 1% sal hipossódico. T4 – 5% partículas probióticas, 0,5% sal hipossódico. T5 – 10% partículas probióticas, 0,5% sal hipossódico. T6 – 10% partículas probióticas, 1% sal hipossódico.

Fonte: Autora.

Queirós, Grimaldi e Gigante (2016) encontraram valor médio de firmeza em manteiga analisada a 10 °C, de 2,18 N, semelhante a firmeza encontrada para a manteiga padrão no presente estudo. Chaves (2014) analisou a firmeza de manteigas e encontrou valores abaixo do encontrado nas manteigas probióticas, em torno de 1,40 N. Figueiroa et al. (2013) avaliaram manteigas quanto aos parâmetros de firmeza e adesividade e encontrou valor médio de 1,78 N para firmeza e – 8,31 para adesividade. Richards e Gioielli (2016) encontraram valor de 1,51 N para firmeza e energia de penetração de 6,75 N em manteigas a 10 °C. Brandão et al. (2015) encontrou valor de 1,40 N no parâmetro firmeza em manteigas

adicionas de óleos essenciais. Entre os fatores que alteram a textura de lácteos é a composição da gordura do leite, por este motivo foi encontrada variação entre os resultados obtido por outros autores, mesmo quando os teores de gordura das manteigas são semelhantes (Frétin et al., 2019), sendo que para esta análise todas as amostras eram provenientes da mesma matéria-prima.

Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) permite analisar as temperaturas e as taxas de calor associadas à transição de estado da manteiga com e sem cápsulas probióticas (Figura 3). Essas informações sobre as mudanças físicas e químicas indicam, primeiramente, o momento em que ocorre a mudança do estado sólido para líquido dos dois materiais. O método de análise da autenticidade das gorduras por DSC baseia-se no fato de que toda gordura possui sua composição característica de ácidos graxos e triacilgliceróis, que são únicos para um determinado tipo de gordura, manifestando-se na característica curva de fusão, entretanto, existem dados limitados na literatura sobre o uso de curvas de fusão para a avaliação de manteiga (Tomaszewska-Gras, 2016).

O primeiro evento endotérmico é caracterizado pelas curvas que a partir do início do aquecimento do material induzem a mudança do estado sólido para o líquido. Os picos diferem em 0,5 °C entre as amostras com (32,77 °C) e sem cápsulas probióticas (32,27 °C). Truong et al. (2018) encontrou ponto de fusão de 31 a 35 °C para manteigas, corroborando com o resultado encontrado por Buldo, Kirkensgaard e Wiking (2013), que encontraram a fusão da manteiga em temperatura média de 32 °C, resultados semelhantes ao encontrado neste estudo. A presença das cápsulas naturalmente eleva essa temperatura de pico, já que se trata de material que demanda maior entalpia para a mudança de estado.

O principal objetivo de determinar as curvas é caracterizar a identidade de calorimetria diferencial de varredura do material com as cápsulas probióticas. As curvas endotérmicas que se encontram em temperaturas acima dos 70° C caracterizam as mudanças de fase das cápsulas que ocorrem em elevadas temperaturas. As amostras com cápsulas probióticas demandam maiores taxas de calor para que ocorram os processos endotérmicos, em temperaturas próximas a 97 °C.

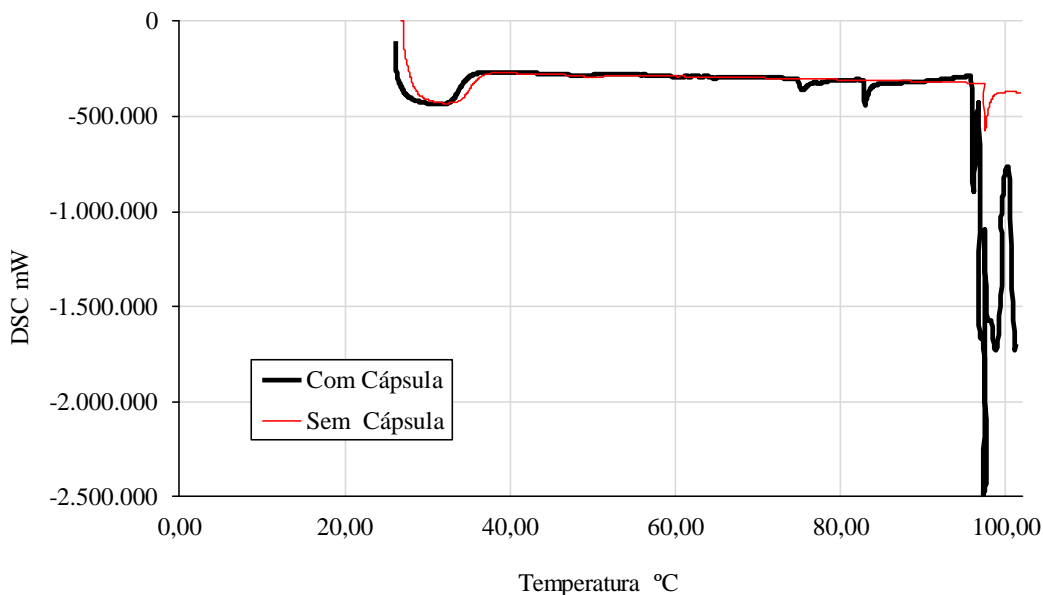


Figura 3 - Transições polimórficas por meio de curvas de fusão em DSC da manteiga com e sem adição de cápsulas probióticas.

Fonte: Autora.

A manteiga adicionada de cápsulas se manifestou em mudanças nos parâmetros de fusão termodinâmicos (temperatura, área e altura dos picos). A análise do DSC mostrou que as cápsulas resistem a uma temperatura média de até 70 °C, podendo, ainda, proteger uma concentração baixa de microrganismos probióticos, conforme as análises de comportamento térmico mostraram. Ao atingir temperatura próxima de 100 °C, o DSC mostrou total fusão das cápsulas, também corroborando com a análise realizada para avaliar o comportamento térmico da manteiga probiótica. Leite (2014) analisou a resistência de cápsulas de alginato e quitosana secas e encontrou fusão das partículas próxima a 130 °C. Paula, Oliveira e Abreu (2010) analisaram cápsulas de alginato vazias na concentração de 5% e encontraram fusão total do material a 194 °C, essa resistência superior ao encontrado nas cápsulas probióticas pode estar relacionada a concentração da solução de alginato, que no presente estudo foi utilizado 1%. Assim, os resultados do estudo mostram que a cápsula não é capaz de proteger suficientemente o microrganismo das condições de temperaturas elevadas, acima de 100 °C.

Análise Sensorial

Participaram da análise 100 provadores não treinados, incluindo estudantes, professores e demais funcionários, todos consumidores de manteiga e maiores de 18 anos (Tabela 10).

Tabela 10 – Informações de gênero e faixa etária dos 100 provadores da análise sensorial da manteiga probiótica com sal hipossódico. Resultados apresentados em número.

Gênero	Feminino		Masculino	
	69		31	
Faixa etária	18 a 25 anos	26 a 35 anos	36 a 45 anos	>45 anos
	82	9	7	2

Fonte: Autora.

As cápsulas probióticas adicionadas na manteiga possuem tamanho suficiente para serem perceptíveis a olho nú, porém, se adicionadas em alimentos de baixa viscosidade, iriam se sedimentar facilmente, além disso, durante a mastigação algumas cápsulas podem ser rompidas e ocasionarem na liberação dos microrganismos ainda na boca (Su et al., 2019). Esses problemas podem ser superados usando-os em alimentos sólidos, semi-sólidos ou altamente viscosos, como queijos, gomas, carnes, manteigas, molhos, pudins, entre outros (Ma et al., 2018). Durante a realização da análise sensorial, os provadores poderiam escrever comentários sobre as amostras de manteigas, sendo que apenas cinco provadores (5%) mencionaram nos comentários estranharem a aparência das partículas, porém 24 provadores (24%) mencionaram não sentir a presença das partículas e 17 (17%) provadores comentaram não ser perceptível as cápsulas na boca durante a mastigação.

Os resultados obtidos foram satisfatórios, conforme apresentado na Tabela 11, demonstrando que a manteiga contendo cápsulas foi aceita pelos provadores e que seria adquirida estando disponível no mercado. De modo geral, as amostras apresentaram uma aceitação acima de cinco, o que corresponde na escala hedônica a “gostei”. O atributo que apresentou maior pontuação para todos os tratamentos foi a cor. Quanto a intenção de compra, as manteigas T1, T5 e T6 foram as que obtiveram maior escolha na opção “certamente compraria”.

Tabela 11 – Resultado da análise sensorial por meio de teste de aceitação e intenção de compra das amostras de manteigas probióticas. Resultados expressos em número de provadores (n = 100).

Manteigas	Cor	Aroma	Sabor	Textura	Aparência global
T1	5,85 ^a	5,41 ^a	5,26 ^a	5,66 ^a	5,54 ^a
T3	5,77 ^a	5,23 ^a	4,97 ^a	5,62 ^a	5,25 ^a
T4	5,82 ^a	5,28 ^a	4,91 ^a	5,36 ^a	5,11 ^a
T5	5,72 ^a	5,23 ^a	5,36 ^a	5,36 ^a	5,10 ^a
T6	5,53 ^a	4,97 ^a	4,37 ^a	5,02 ^a	4,75 ^a
C.V. (%)	12,67	13,72	10,75	11,52	13,51

Manteigas	Certamente não compraria	Provavelmente não compraria	Talvez sim/ Talvez não	Provavelmente compraria	Certamente compraria
T1	4	8	22	30	36
T3	2	22	25	43	8
T4	4	27	20	27	22
T5	0	5	19	41	35
T6	5	7	16	37	35

Escala hedônica de 7 pontos: 7 = gostei muitíssimo; 6 = gostei muito; 5 = gostei; 4 = indiferente; 3 = desgostei; 2 = desgostei muito; 1 = desgostei muitíssimo.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Legenda: T1 – tratamento padrão. T3 – 5% partículas probióticas, 1% sal hipossódico. T4 – 5% partículas probióticas, 0,5% sal hipossódico. T5 – 10% partículas probióticas, 0,5% sal hipossódico. T6 – 10% partículas probióticas, 1% sal hipossódico.

Fonte: Autora.

A manteiga adicionada de cápsulas probióticas e sal hipossódico se mostrou aceita pelos provadores e as análises físico-químicas, tecnológicas, microbiológicas, vida de prateleira e simulação gastrointestinal comprovaram a qualidade e eficiência probiótica.

CONCLUSÃO

A manteiga com *Lactobacillus acidophilus* encapsulado apresentou uma viabilidade maior entre as formulações testadas. Na forma livre, o microrganismo não apresentou concentração suficiente para enquadrar-se como produto probiótico, estando abaixo de 8,0 log UFC g⁻¹ durante todo o período de armazenamento. Entre as formulações de manteiga com probiótico encapsulado, os tratamentos T5 e T6 apresentaram os resultados mais satisfatórios para viabilidade probiótica. Ressalta-se que a vida de prateleira das manteigas encerra-se com 45 dias de armazenamento por dois motivos: (1) a inviabilidade do *Lactobacillus acidophilus* e (2) o aparecimento de bolores nas cápsulas, conforme mostraram os resultados de vida de

prateleira. O teste *in vitro* mostrou que o microrganismo encapsulado e aplicado na manteiga suporta a passagem pelo trato gastrointestinal, liberando o *Lactobacillus acidophilus* apenas no intestino e apresentando contagem próxima a inicial.

A composição físico-química das manteigas mostra que existe diferença entre o tratamento padrão e os adicionados de cápsulas, porém, os tratamentos atendem aos parâmetros exigidos pela legislação, exceto para os teores de gordura (T6) e umidade (T5 e T6). Durante o comportamento térmico, observou-se que os microrganismos encapsulados se comportam de melhor maneira em temperatura de refrigeração e que a manteiga probiótica não deve ser aquecida acima de 50 °C. Ainda, por meio do DSC foi possível confirmar que próximo de 100 °C ocorre a desestruturação e fusão das cápsulas.

De acordo com a análise sensorial, as manteigas não apresentaram diferença significativa entre si, de modo geral, havendo boa aceitação em todos os parâmetros avaliados, indicando que a manteiga com cápsulas probióticas e sal hipossódico foi aceita pelos provadores.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

CONFLITOS DE INTERESSE

"Não há conflitos a serem declarados".

REFERÊNCIAS

Ahmed SSJ, Abdalla MOM, Rahamtalla, SA. Microbiological quality of cows' milk butter processed in khartoum state, Sudan. Br Microbiol Res J. 2016 11:1-10.

AOAC. Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists. (18th ed.). Gaithersburg, Maryland, 2005.

Barros PAV, Glória MBA, Lopes FCF, Gama MAS, Souza SM, Mourthé, MHF, Leão MI. Qualidade nutricional e estabilidade oxidativa de manteigas produzidas do leite de vacas

alimentadas com cana-de-açúcar suplementada com óleo de girassol. Arq Bras Med Vet Zootec. 2013 65(5):1545-1553.

Brandão YB et al. Avaliação Físico-química e Sensorial de Manteiga Adicionada de Óleo Essencial de Orégano e em Embalagem Ativa Biodegradável. Rev Cienc Exatas Nat. 2015 17(2).

Brasil. Portaria N° 146, de 7 de março de 1996, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, de 11 de março de 1996. Seção 1, página 3977. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Manteiga.

Brasil. Resolução n° 04, de 28 de junho de 2000. Institui o produto denominado Manteiga Comum. Diário Oficial da União, 05 de julho de 2000.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC N° 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União. Poder Executivo, de 10 de janeiro de 2001.

Brasil. Resolução RDC n° 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 República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 09 de janeiro de 2002.

Brasil. Instrução Normativa N° 62, 26 de Agosto de 2003. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial da União de 18 de setembro de 2003, Seção 1, Página 14.

Brasil. Portaria n° 54, de 4 julho de 1995. Ministério da Saúde. Aprovar o Padrão de Identidade e Qualidade para Sal Hipossódico. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 5 de julho de 1995.

Buldo P, Wiking L. Butter: Properties and Analysis. Reference Module in Food Science. Encyclopedia of Food and Health 2016:535-541.

Buldo P, Kirkensgaard JJK, Wiking L. Crystallization mechanisms in cream during ripening and initial butter churning. *Journal of Dairy Science* 2013 96(11): 6782-6791.

Cavalheiro CP. Probióticos encapsulados aplicados em produtos cárneos. 151p. Tese (Doutorado) do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2016.

Champagne CP et al. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *Int J Food Microbiol* 2011 149:185-193.

Chaves BW. Qualidade de manteigas produzidas com leite de vacas jersey sob diferentes níveis de óleo de girassol na dieta. 98 p. Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2014.

Chen LS, Ma Y, Maubois JL, Chen LJ, Liu QH, Guo JP. Identification of raw milk yeasts and selection for some antioxidant properties specific. *Int J Dairy Technol* 2010 63(1):47-54.

Christie WW. A simple procedure for rapid transmethylation of glicerolipids and cholesterol esters. *J Lipid Res* 1982 23(1072).

Claes IJJ, Vargas García CE, Lebeer S. (2015). Novel opportunities for the exploitation of host–microbiome interactions in the intestine. *Curr Opin Biotechnol* 2015 32:28-34.

Colla LM, Hernández CP. Congelamento e descongelamento: sua influência sobre os alimentos. *Vetor*, Rio Grande, 2003 13:53-66.

Cook MT, Tzortzis G, Charalampopoulos D. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *J Control Release* 2012 162:56-67.

Corona-Hernandez RI et al. Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: a review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2013 12:614-628.

Erkaya T et al. Probiotic butter: stability, free fatty acid composition and some quality parameters during refrigerated storage. *Int Dairy J* 2015 49:102-110.

Etchepare MA. Produção, caracterização e viabilidade de micropartículas com *Lactobacillus acidophilus* obtidas por gelificação iônica. 120 p. Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2014.

Etchepare MA. Desenvolvimento, caracterização e estudo da viabilidade de micropartículas contendo *Lactobacillus acidophilus* la-14 obtidas por gelificação iônica externa associadas à interação eletrostática. 121p. Tese (Doutorado) do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2017.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Diretrizes para a avaliação de probióticos em alimentos. London, Ontario, Canada. 2002 April 30 and May 1.

Fávaro-Trindade CS, Heinemann RJB, Pedroso DL. Review: developments in probiotic encapsulation. *CABI Rev: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 2011 6:1-8.

Fernandes RVB et al. Avaliação dos parâmetros físico-químicos de manteigas do tipo comum. *Rev Acad: Ciências Agrárias e Ambientais* 2012 10(2):171-176.

Figueiroa et al. Production, composition and fatty acid profile of milk and butter texture of dairy cows fed ground or pelleted concentrate with sunflower and/or lignosulfonate. *R Bras Zootec* 2013 42(10):743-750.

Findik O, Andiç S. Some chemical and microbiological properties of the butter and the butter oil produced from the same raw material. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie. Food Sci Technol* 2017 86:233–239.

Frétin M, Martin B, Buchin S, Desserre B, Ferlay A. Milk fat composition modifies the texture and appearance of Cantal-type cheeses but not their flavor. *J Dairy Sci* 2019 102:1131-1143.

Fritzen-Freire CB, Prudêncio ES, Pinto SS, Muñoz IB, Amboni RDMC. Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. LWT - Food Sci Technol, 2013 50:39-44.

Gbassi GK, Vandamme T. Probiotic Encapsulation Technology: from Microencapsulation to Release into the Gut. Basel: Pharmaceutics 2012 4(1), 149-163.

Gomes AA et al. Effect of the inoculation level of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic cheese on the physicochemical features and sensory performance compared with commercial cheeses. J Dairy Sci, 2011 94:4777-4786.

Granato D et al. Probiotic dairy products as functional foods. Comp Rev Food Sci Technol, 2010 9(5):455-470.

Hara A, Radin NS. Lipid extraction of tissues of low toxicity solvent. Anal biochem, 1978 90:420-426.

Hill C. Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2014 11:506-514.

Holkem AT, Raddatz GC, Nunes GL et al. Development and characterization of alginate microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 produced by emulsification/ internal gelation followed by freeze drying. LWT - Food Sci Technol 2016 71:302-308.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1020 f. 2008.

Ignácio AF, Rodrigues JTD, Niizu PY, Chang YK. Efeito da Substituição de Cloreto de Sódio por Cloreto de Potássio em Pão Francês. Braz J Food Technol 2013 16(1).

Iravani S et al. Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. *J Food Sci Technol* 2015 52(8):4679-4696.

Kailasapathy K. Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. *CAB Rev: Perspectivas na Agricultura, Ciências Veterinárias, Nutrição e Recursos Naturais*, 2009 4(33):1-19.

Kim WS, Perl L, Park HJ, Tandianus EJ, Dunn WM. Assessment of stress response of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Curr Microbiol* 2001 43(5):346-350.

Kontkanen H, Rokka S, Kemppinen A, Miettinen H et al. Enzymatic and physical modification of milk fat: A review. *Int Dairy J*, 2011 21:3-13.

Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. The influence of coating material on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int Dairy J*. 2004 14(8):737-743.

Lawless H, Heymann H. *Sensory Evaluation of Food Science Principles and Practices*. Chapter 1, 2nd Edition, Ithaca, New York, 2010.

Ledoux M, Chadigny JM, Darbois M, Soustre Y, Sébédio JL, Laloux, L. Fatty acid composition of French butters, with special emphasis on conjugated linoleic acid (CLA) isomers. *J Food Compos Anal*, 2005 18:409-425.

Leite MV. Microcápsulas de alginato-quitosana contendo nanopartículas magnéticas para liberação controlada de progesterona. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, 104 f. 2014.

Liu H, Gong J, Chabot DS et al. Incorporation of polysaccharides into sodium caseinate-low melting point fat microparticles improves probiotic bacterial survival during simulated gastrointestinal digestion and storage. *Food Hydrocoll*, 2016 54:328-337.

Luccas V, Kieckbusch TG. Comparative Study of the Polymorphism of Cupuassu Fat and Cocoa Butter Using Differential Scanning Calorimetry. *Braz J Food Technol* 2006 9(1):63-68.

Ma D, Tu Z, Wang H, Zhang Z, McClements DJ. Microgel-in-microgel biopolymer delivery systems: Controlled digestion of encapsulated lipid droplets under simulated gastrointestinal conditions. *J Agric Food Chem* 2018 66(15):3930-3938.

Madureira AR, Amorim M, Gomes AM, Pintado ME, Malcata FX. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Res Int* 2011 44:465–470.

Maestrelli F et al. Development of enteric-coated calcium pectinate microspheres intended for colonic drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2008 69(2):508-518.

Mallia J, et al. Determination of storage stability of butter enriched with unsaturated fatty acids/conjugated linoleic acids (UFA/CLA) using instrumental and sensory methods. *Int Dairy J*, 2008 18(3):983–993.

Martín MJ, Lara-villoslada F, Ruiz MA, Morales ME. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2015 27:15-25.

Méndez-Cid FJ, Centeno JA, Martínez S, Carballo, J. Changes in the chemical and physical characteristics of cow's milk butter during storage: Effects of temperature and addition of salt. *J Food Compos Anal*, 2017 63:121-132.

Menezes CR et al. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. *Ciênc Rural*, 2013 43(7):1309-1316.

Paula CB, Oliveira EF, Abreu MS. Esferas (Beads) de Alginato como Agente Encapsulante de Óleo de Croton zehntneri Pax et Hoffm Haroldo. *Polímeros* 2010 20(2):112-120.

Queirós MS, Grimaldi R, Gigante ML. Addition of olein from milk fat positively affects the firmness of butter. *Food Res Int*, 2016 84:69-75.

Ranadheera CS et al. Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. *Food Chem*, 2013 135:1411-1418.

Ranadheera CS, Baines SK, Adams MC. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res Int*, 2010 43:1-7.

Richards NSPS, Gioielli LA. *Desenvolvimento e caracterização de manteigas aromatizadas*. 1. ed. Saarbrücken, Alemanha: VDM Publishing, 240 f. 2016.

Roberfroid MB. Inulin-type fructans: functional food ingredients. *J Nut* 2007 137(11): 2493S-2502S.

Sabikhi L, Babu R, Thompkinson DK, Kapila S. Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 processing heat treatments and simulated gut conditions. *Food Bioproc Tech*, 2010 3:586-593.

Salam MHA et al. Preparation and properties of probiotic cheese high in conjugated linoleic acid content. *Int J Dairy Technol* 2011 64:64-74.

Samet-Bali O et al. Traditional Tunisian butter: Physicochemical and microbial characteristics and storage stability of the oil fraction. *LWT - Food Sci Technol*, 2009 42:899-905.

Sánchez B, Ruiz L, Guidemond M, Ruas-Madiedo P, Margolles A. Toward improving technological and functional properties of probiotics in foods. *Trends Food Sci Technol*, 2012 26:56-63.

Senel E, Atamer M, Öztekin FS. The oxidative and lipolytic stability of Yayik butter produced from different species of mammals milk (cow, sheep, goat) yoghurt. *Food Chem*, 2011 127:333-339.

Sheu TY, Marshall RT. Micro-encapsulation of *Lactobacillus* in calcium alginate gels. J Food Sci, 1993 54:557-561.

Shori AB. Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit. J Biosci, 2017 24(1):1-5.

Silva AS, Honjaya ER, Inay OM, Costa MR, Souza CHBS, Santana EHW, Suguimoto HH, Aragon-Alegro LC. Viability of *Lactobacillus casei* in chocolate flan and its survival to simulated gastrointestinal conditions. Semina: Ciênc Agr, Londrina, 2012 33(2):3163-3170.

Silva MP et al. Semisweet chocolate as a vehicle for the probiotics *Lactobacillus acidophilus* LA3 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1: Evaluation of chocolate stability and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. LWT - Food Sci Technol 2017 75:640-647.

Sohail A et al. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. Int J Food Microbiol 2011 145(1):162- 168.

Su Y, Gu L, Zhang Z, Chang C, Li J, McClements DJ, Yang Y. Encapsulation and release of egg white protein in alginate microgels: Impact of pH and thermal treatment. Food Res Int, 2019 120:305-311.

Tomaszewska-Gras J. Rapid quantitative determination of butter adulteration with palm oil using the DSC technique. Food Control, 2016 60:629-635.

Tripathy MK, Giri SK. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. J Funct Foods, 2014 9:225-241.

Truong T, Palmer M, Bansal N, Bhandari B, ARC Dairy Innovation Hub. Effects of dissolved carbon dioxide in fat phase of cream on manufacturing and physical properties of butter. Journal of Food Engineering 2018 226: 9-21.

Tvrzicka E, Kremmyda LS, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease—a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomed pap*, 2011 155(2):117-130.

Visentainer V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. *Quím Nov*, 2012 35:274-279.

Ying D et al. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein and resistant starch matrices: Probiotic survival in fruit juice. *J Funct Foods*, 2013 5(1):98-105.

Ying DY, Sun J, Sanguansri L, Weerakkody R, Augustin MA. Enhanced survival of spray-dried microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in the presence of glucose. *J Food Eng*, 2012 109:597-602.

Yonekura L, Sun H, Soukoulis C, Fisk I. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after *in vitro* digestion. *J Funct Foods*, 2014 6:205-214.

Zandstra EH, Lion R, Newson RS. Salt reduction: Moving from consumer awareness to action. *Food Qual Prefer*, 2016 48:376-381.

3.6 MANUSCRITO 4

**PROBIÓTICOS COMERCIAIS: TESTE *IN VITRO* PARA AVALIAR A EFICIÊNCIA
NO TRATO GASTROINTESTINAL**

SILVA¹, Maritiele Naissinger da; RICHARDS², Neila Silvia Pereira dos Santos (...)

¹Doutoranda. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: maritielens@gmail.com

²Professora orientadora. Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: neilarichardsprof@gmail.com

RESUMO

A busca por alimentos funcionais cresce constantemente, e nessa procura, também cresce a oferta das indústrias que buscam produzir e comercializar complementos, como é o caso de probióticos comercializados livremente em farmácias e mercados. Esses produtos costumam utilizar rotulagem apelativa e induzir o consumidor a adquirir esses probióticos, os quais, por muitas vezes, não oferecem os benefícios descritos na embalagem. Visto o grande número de alimentos com apelo probiótico e complementos comercializados sem a necessidade de prescrição nutricional ou médica, este estudo surgiu com o intuito de avaliar a viabilidade de células de probióticos comerciais, por meio de simulação gastrointestinal *in vitro*. Os resultados encontrados mostram que apenas três amostras possuem concentração mínima de 8 log UFC g⁻¹, que é a contagem mínima aceita para comercialização pela legislação brasileira para alimentos probióticos.

Palavras-chave: Alimentos funcionais. Probióticos. Simbiótico. Suplemento.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a busca por alimentos funcionais aumentou consideravelmente, uma vez que os alimentos passaram a ser vistos não somente como uma fonte de nutrientes, mas também como um promotor de bem-estar e saúde, devido à redução do risco de doenças (ROUXINOL-DIAS et al., 2016). Com isso, existe o interesse no desenvolvimento de suplementos alimentares que promovam benefícios a saúde (OZOGUL; HAMED, 2016).

O consumo de suplementos probióticos vem ganhando destaque nos últimos anos, sendo comercializados no formato de cápsulas ou em pó (sachês) em farmácias. A administração oral desses microrganismos resulta em uma grande perda da viabilidade, devido à passagem pelo sistema gastrointestinal, sendo injuriados pela elevada acidez do estômago e a presença de sais biliares ao alcançar o intestino (COOK et al., 2012).

Quando os probióticos são consumidos dessa forma, se exclui o efeito sinérgico do alimento ocasionando uma redução da funcionalidade. Nesse contexto, os alimentos servem como veículos para a entrega dos probióticos, podendo proteger esses micro-organismos durante o processo digestivo. Entretanto, alguns fatores podem afetar a sobrevivência dos probióticos, como o conteúdo de gordura, tipo e concentração de proteínas, açúcares e pH (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

A RDC nº 241 de 26 de julho de 2018 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2018), dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos e define que probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do indivíduo. A comprovação da segurança dos probióticos e dos seus benefícios à saúde requer a caracterização e identificação inequívoca da linhagem do microrganismo, por meio da apresentação de documentos técnicos ou estudos científicos que

identifiquem a espécie, de acordo com a nomenclatura binomial mais atual; identifiquem e caracterizem a linhagem, por meio de métodos genotípicos e fenotípicos; especifiquem a origem da linhagem; e comprovem o depósito da linhagem em uma coleção de cultura internacionalmente reconhecida (BRASIL, 2018; BRASIL, 2019).

O benefício à saúde associado ao uso do probiótico deve estar claramente identificado e refletir da forma mais adequada o conjunto de evidências apresentadas. Nos produtos adicionados de probióticos, o benefício deve ser comunicado por meio da alegação de propriedade funcional ou de saúde aprovada para a linhagem, exceto quando houver disposição em contrário em regulamento técnico específico. O benefício alegado pode ter caráter geral ou específico, levando em consideração a totalidade e o nível das evidências disponíveis (BRASIL, 2018; BRASIL, 2019).

A comprovação do benefício para probióticos requer demonstração da sobrevivência às condições do trato digestório humano e evidências de efeito em humanos obtidas por meio de estudos que sejam conduzidos com a linhagem do microrganismo; que envolvam um grupo representativo da população de interesse ou cujos resultados possam ser extrapolados para aquela de interesse; que considerem a quantidade mínima sugerida para obtenção do benefício; que avaliem desfechos relevantes para o benefício alegado; e minimizem vieses e fatores de possam confundir o consumidor (BRASIL, 2018; BRASIL, 2019).

Os alimentos funcionais constituem hoje a prioridade de pesquisa na área de nutrição e tecnologia de alimentos, levando-se em conta o interesse do consumidor por alimentos mais saudáveis (SANTOS; GOULART; RAMOS, 2012). O termo alimento funcional foi definido inicialmente no Japão, durante a década de 1980, como “alimento para uso específico de saúde”. O conceito contemporâneo refere-se aos alimentos ou nutrientes cuja ingestão leva a importantes mudanças fisiológicas no organismo, isoladas ou distintas daquelas associadas ao seu papel de nutriente (FDA, 2004).

São considerados alimentos funcionais os alimentos que além do seu valor nutritivo, inerente à sua composição química, possam afetar benéficamente determinadas funções do organismo, contribuindo, para a manutenção do bem-estar e da saúde (ZHANG et al., 2019). A Resolução nº 243 de 26 de julho de 2018, da ANVISA, descreve suplemente alimentar como “produto para ingestão oral, apresentado em formas farmacêuticas, destinado a suplementar a alimentação de indivíduos saudáveis com nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos” (BRASIL, 2018). Os prebióticos e os probióticos são atualmente os principais aditivos alimentares que compõem esses alimentos funcionais.

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). Para promover seus efeitos benéficos no hospedeiro, os probióticos devem sobreviver ao trânsito gastrointestinal, as condições ácidas do ambiente gástrico e serem capazes de atingir o intestino grosso em quantidades adequadas para permitir a colonização e a proliferação. Os principais microrganismos utilizados pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (LI et al., 2011).

Quanto aos prebióticos, são oligossacarídeos não digeríveis fermentáveis, que modificam a atividade e função da microflora intestinal, de forma a promover a saúde do indivíduo (KHANGWAL; SHUKLA, 2019). Uma classe bastante conhecida são os frutoligossacarídeos (FOS), polímeros ricos em frutose (NOBRE; NASCIMENTO; SILVA, 2019). A combinação de probióticos e prebióticos é denominada de simbiótico, e tem finalidade de melhorar a sobrevivência e implantação de cepas microbianas vivas selecionadas no trato gastrointestinal, que afetam benéficamente o hospedeiro (FLESCH et al., 2014).

Os microrganismos probióticos podem ter sobrevivência maior no trato gastrointestinal caso seu substrato específico seja prontamente disponível para fermentação.

Portanto, o consumo de simbiótico pode aumentar a população de bactérias probióticas do hospedeiro, tanto por ingerir os microrganismos, quanto por favorecer a sua multiplicação através dos prebióticos (LENHART; CORNELE, 2009). Esse efeito foi demonstrado em estudos que verificaram que a dieta com combinação simbiótica se mostrou mais eficaz do que as dietas de prebióticos e probióticos isoladas (LE LEU et al., 2009; WORTHLEY et al., 2009).

Os simbióticos, além de favorecer a sobrevivência do microrganismo no intestino do hospedeiro, contribui para a viabilidade probiótica no alimento. Isso provavelmente ocorre devido à interação entre eles antes do consumo, podendo, em alguns casos, resultar em uma vantagem competitiva para o probiótico. Por essa razão, é importante que a seleção do prebiótico e do probiótico possua sinergia (KHANGWAL; SHUKLA, 2019).

Para um alimento ser comercializado com alegações de trazer benefícios à saúde, devido à adição de probióticos, deve conter um número de células viáveis de culturas probióticas de, pelo menos, 10^6 a 10^7 UFC/g ou na porção a ser consumida (FAO/WHO, 2002), e para que ocorra ação benéfica no intestino, devem ser capazes de sobreviver as condições de processamento e armazenamento, ser ingeridos em quantidades adequadas, alcançando o número viável de microrganismos (CHAMPAGNE et al., 2011, SOHAIL et al., 2011). A ANVISA (BRASIL, 2008) recomenda que a quantidade mínima de probiótico deva estar entre $10^8 - 10^9$ UFC na recomendação diária do produto que os contenha, antes da ingestão, para garantir que um mínimo terapêutico suficiente de $10^6 - 10^7$ UFC/g possa atingir o cólon (NAZZARO et al., 2009).

Os microrganismos probióticos estão geralmente disponíveis como concentrados de cultura na forma seca ou congelada para serem adicionados a um alimento para uso industrial ou doméstico. Estes podem ser consumidos como produtos alimentares ou como suplementos

dietéticos, na forma de produtos em pó (sachês), cápsulas ou comprimidos (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Porém, a maioria dos probióticos não tem a capacidade de sobreviver em grande quantidade devido ao baixo pH ($\text{pH} = 2$) no suco gástrico, que limita sua eficácia na maioria dos alimentos funcionais (SHORI, 2017). Os modelos de digestão *in vitro* são amplamente utilizados com o objetivo de estudar, através da simulação das condições gastrointestinais, as alterações estruturais, a digestibilidade e a liberação de compostos presentes nos alimentos (HUR et al., 2011).

O uso de probióticos na alimentação é mais comumente evidenciado em produtos lácteos como kefir, leites fermentados e iogurte. Esses alimentos possuem características favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos e já possuem em sua flora normal bactérias ácido lácticas probióticas (ALMEIDA et al., 2008; ALMEIDA et al., 2009; ZOELLNER et al., 2009). No entanto, alguns produtos desidratados ou liofilizados, ao sofrerem os processos tecnológicos de cocção, desidratação ou secagem, essa flora benéfica pode ser destruída (CHEN et al., 2014).

O interesse pela adição de microrganismos probióticos em diferentes alimentos vêm crescendo, como forma de aumentar seu valor nutricional e terapêutico (MARTÍN et al., 2015; SIMEONI et al., 2014). Porém a principal dificuldade encontrada pelas indústrias na adição de bactérias probióticas em alimentos funcionais está relacionada à manutenção e viabilidade destas culturas. Dessa forma, diversos pesquisadores já avaliaram a resistência dos microrganismos em fluidos gastrointestinais, simulando o processo digestivo por ensaios *in vitro* (FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002; PICOT; LACROIX, 2004; LISERRE; RÉ; FRANCO, 2007; GBASSI et al., 2009; GEBARA et al., 2013). Esses ensaios são fundamentais para verificar se o microrganismo foi viável e eficiente para o consumidor.

Os testes *in vitro* mais utilizados para a avaliação de probióticos em alimentos são as análises de resistência à acidez gástrica e aos sais biliares, baseados em estudos de sobrevivência e desenvolvimento, pois a tolerância à bile é considerada como uma característica importante de cepas de *Lactobacillus* sp., por exemplo, o que lhes permite sobreviver, multiplicar-se e exercer a sua ação no trânsito gastrointestinal (FAO/WHO, 2006; ARGYRI et al., 2013).

O objetivo desse estudo foi avaliar a viabilidade, por meio de simulação gastrointestinal *in vitro*, de probióticos comercializados como compostos funcionais, na forma de suplementação, comparando com as informações disponíveis no rótulo dos produtos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram avaliados 11 probióticos comerciais e dada a denominação de A1 a A11. Destes, três foram fornecidos, para realização de testes por empresas especializadas, podendo ser aplicados em produtos (A1, A2 e A3). As amostras A4, A5 e A11 foram adquiridas em farmácias de manipulação, sem haver indicação para o modo de consumo e preparo. As amostras A6, A7, A8 e A9 foram adquiridas em farmácias convencionais e a amostra A10, que é um leite fermentado, foi adquirida em supermercado. O experimento *in vitro* foi realizado em triplicata. As amostras não faziam parte do mesmo lote de fabricação e foram analisadas dentro do prazo de validade e mantida as condições de armazenamento indicado no rótulo de cada produto.

Ativação de cultura liofilizada

As culturas probióticas (A1, A2 e A3) foram ativadas anteriormente ao uso, conforme recomendação dos fabricantes. O método de ativação utilizado foi em caldo MRS (Sigma-Aldrich®), utilizando 1 g de probiótico para cada 100 mL de caldo, e após incubadas durante 15 horas a 37 °C. Posteriormente a incubação para ativação, a cultura juntamente com o caldo MRS foram centrifugados a 4670 x g por 15 minutos em centrífuga refrigerada e lavadas as amostras em solução de NaCl (0,85% m/v) por duas vezes, ficando, desta maneira, aptas para consumo ou aplicação em produtos.

Contagem das células probióticas viáveis

A contagem de células probióticas viáveis foi realizada após a ativação dos microrganismos que passaram por esse processo; antes da simulação da digestão dos produtos, ou seja, no momento em que as embalagens eram abertas; e em cada etapa da passagem pelo trato gastrointestinal do experimento *in vitro*.

Para proceder a análise, foram transferidas alíquotas de 1,0 g em diluições adequadas, em triplicata, para placas de Petri descartáveis. Para as espécies *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei* realizou-se plaqueamento por profundidade em ágar MRS (Kasvi®), e para determinar a concentração de *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis* e *Bifidobacterium animalis* foi adicionado 0.5% de solução A (dicloxacilina na concentração de 0,01% m/v), 1,0% de solução B (cloreto de lítio a 11,0% m/v) e 0,5% de solução C (cloreto de cisteína a 10,0% m/v) em ágar MRS (Kasvi®) e realizado plaqueamento por profundidade. Após a inoculação, as placas foram incubadas invertidas em jarra de anaerobiose, em estufa bacteriológica a 37 °C por 72 h.

Teste de resistência *in vitro* às condições gastrointestinais

A viabilidade dos probióticos comerciais frente às condições gastrointestinais foram avaliadas conforme descrito por Madureira et al. (2011). A viabilidade foi avaliada sequencialmente em meios que simulam as diferentes seções do trato gastrointestinal (esôfago/estômago, duodeno e íleo). Foram utilizadas alíquotas de 1 g de amostra adicionadas de 9 mL de água peptonada, sendo preparadas igualmente em três em erlenmeyers e todos submetidos às mesmas condições para simulação gastrointestinal.

Previamente foram preparadas e autoclavadas uma solução ácida (HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e uma solução básica (NaHCO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) para ajuste do pH das amostras ao longo da simulação gastrointestinal. Inicialmente, o pH foi ajustado a 6,9, para simular a acidez da boca, permanecendo por dois minutos nessa condição e partindo para próxima etapa.

Na etapa esôfago-estômago utilizou-se 25 mg mL^{-1} de pepsina (Sigma[®]), preparada em HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, esta solução foi adicionada, em alíquotas iguais, durante toda a fase gástrica, a uma quantidade de $0,05 \text{ mL mL}^{-1}$, seguindo as seguintes etapas de pH/tempo (minutos): 5,5/10 minutos, 4,6/10 minutos, 3,8/10 minutos, 2,8/20 minutos, 2,3/20 minutos e 2,0/20 minutos em uma rotação de 130 rpm, adicionando a pepsina ($0,05 \text{ mL mL}^{-1}$) e sendo o pH ajustado utilizando HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em cada etapa. Ao final desta fase, era retirado um dos erlenmeyers e submetido imediatamente as análises de contagem de células probióticas viáveis correspondentes ao estômago.

Na etapa referente ao duodeno utilizou-se, a uma concentração de $0,25 \text{ mL mL}^{-1}$, uma solução contendo 2 g L^{-1} de pancreatina (Sigma[®]) e 12 g L^{-1} de sais biliares bovinos (Sigma[®]), preparada em NaHCO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, sendo o pH ajustado para 5,0 com a adição da solução de enzimas pancreatina e bile ($0,25 \text{ mL mL}^{-1}$) e permanecendo por 20 minutos a 45

rpm, ao final, era retirada o segundo erlenmeyer que correspondia a etapa do duodeno e também submetido imediatamente as análises de contagem de células probióticas viáveis.

A etapa referente ao íleo foi realizada por um aumento do pH para 6,5, utilizando uma solução de NaHCO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, permanecendo por 90 minutos em rotação de 45 rpm, e ao final era submetido as análises para contagem de células probióticas viáveis.

Todas as soluções foram preparadas imediatamente no momento da utilização e esterilizadas com membrana de poro $0,22 \mu\text{m}$ (Minisart, Sartorius Stedim Biotech, Alemanha), as enzimas eram armazenadas em temperaturas de $-18 \text{ }^\circ\text{C}$.

A análise foi conduzida em uma incubadora refrigerada tipo Shaker (TE-421, Tecnal, Brasil) mantida a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, com o intuito de simular a temperatura do corpo humano e a agitação mecânica foi utilizada em paralelo para simular os movimentos peristálticos intestinais, com intensidades semelhantes às alcançadas na seção do trato digestivo. Ao final de cada etapa, foram retiradas alíquotas para a contagem das células probióticas viáveis, conforme descrito anteriormente.

Análise estatística

Os dados obtidos em planilhas do Microsoft Office Excel[®], foram analisados conforme delineamento inteiramente casualizado, aplicando análise descritiva, análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias, em um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). O programa estatístico utilizado foi o SPSS[®] versão 15.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inúmeros benefícios à saúde têm sido atribuídos à ingestão de probióticos, porém, é importante ressaltar que tais benefícios somente ocorrem se os mesmos estiverem totalmente viáveis nos produtos onde serão incluídos, ou seja, que sobrevivam durante seu processamento e condições de armazenamento, sendo assim ingeridos em quantidades adequadas, alcançando um número viável de microrganismos ($10^6 - 10^7$ UFC g^{-1}) (SOHAIL et al., 2011; TRIPATHI; GIRI, 2014). No Brasil, a legislação recomenda $10^8 - 10^9$ UFC g^{-1} na recomendação diária do produto pronto para consumo (BRASIL, 2008).

A partir da rotulagem dos probióticos analisados (Tabela 1), foi possível identificar a composição de microrganismos em cada produto e concentração dos mesmos. Também foi observado no rótulo se os produtos precisavam passar por um processo de ativação ou reconstituição, percebendo que a única informação aplicável para todas as amostras era a indicação para não utilizar os produtos em alimentos quentes e nem os submeter ao calor excessivo, com exceção da amostra A10, que era um leite fermentado e o consumo era indicado refrigerado e não mencionada na embalagem sobre cuidados com aquecimento.

A Tabela 2 apresenta os resultados da viabilidade probiótica dos produtos analisados, mostrando a concentração inicial e a sobrevivência durante a simulação da passagem pelo trato gastrointestinal.

A digestão inicia-se na boca, continua no estômago, e termina na porção proximal do intestino delgado, principalmente no duodeno. A parede do estômago é constituída por camadas musculares que misturam os alimentos através dos movimentos peristálticos. Poucos nutrientes presentes nos alimentos podem ser absorvidos ao nível do estômago, a maioria são absorvidos no intestino delgado, devido a ação de enzimas presentes no suco pancreático e na bile (MADUREIRA et al., 2011; SHORI, 2017).

Entre os 11 probióticos avaliados, apenas dois (A10 e A11) possuem em sua composição *Bifidobacterium* sp. isoladamente. As amostras A1, A2, A3, A4, A5 e A6 são compostos apenas por *Lactobacillus* sp. e as amostras A7, A8 e A9 são compostas por uma associação de ambos os gêneros probióticos.

A amostra A10, composta por *B. animalis*, foi adquirida em supermercado, sendo comercializada como leite fermentado. O produto A11, composto por *B. bifidum* foi adquirido em farmácia de manipulação, da mesma maneira que as amostras A4 e A5, que possuem exclusivamente *Lactobacillus acidophilus*. Esses microrganismos, adquiridos em farmácias de manipulação, são comercializados livremente para consumidores, sem necessidade de prescrição médica ou de nutricionista, e além disso não são informadas maneiras de consumo e nem a concentração de células viáveis presente. A indicação para consumo fica a critério do consumidor, podendo ingerir diluído em líquidos ou adicionado em alimentos, sem haver indicação de quantidade adicionada na porção ou consumo diário.

Segundo a legislação, Resolução nº 2, de 7 de janeiro de 2002, que aprova o Regulamento Técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional, o produto não pode ter finalidade medicamentosa ou terapêutica, qualquer que seja a forma de apresentação ou o modo como é ministrado deve ser seguro para o consumo humano, sem necessidade de orientação e ou acompanhamento médico, a não ser que seja dirigido a grupos populacionais específicos (BRASIL, 2002).

Durante a simulação gastrointestinal, é possível observar que houve diminuição na concentração de células viáveis em todas as 11 amostras, mostrando diferença estatística significativa ($p < 0,05$) da contagem inicial até a chegada no íleo. Shinde et al. (2019) analisando a eficácia funcional de probióticos às condições gástricas simuladas encontraram diminuição significativa na contagem de *L. acidophilus* no final da fase gástrica, com queda significativa na contagem de células de 1,03 log UFC/mL no final da fase intestinal.

Entre as amostras contendo *Lactobacillus* sp., a amostra A1 foi a única que não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) na concentração probiótica entre a contagem inicial e a passagem pelo trato gastrointestinal durante a simulação *in vitro*. O pH baixo do estômago limita a atuação dos microrganismos probióticos (SHORI, 2017). O mesmo ocorreu com a amostra A9 quando analisada a viabilidade do *Bifidobacterium lactis*, que mostrou concentração constante durante a simulação. Os *Lactobacillus* sp. tem como característica ser mais resistentes ao baixo pH (LEE; SALMINEN, 2009).

Entre as amostras que apresentavam na composição *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. (A7, A8 e A9), o probiótico A7 apresentou concentração adequada para ambos os gêneros de microrganismos, com contagem superior a $7 \log \text{UFC g}^{-1}$ na etapa do duodeno. As amostras A8 e A9 são simbióticos, pois possuem em sua composição frutooligossacarídeos, juntamente com os probióticos, o que contribuiu para otimizar a ação dos probióticos quando consumidos em conjunto.

Por esse motivo, entende-se que esses produtos devem ser consumidos em maior quantidade (6 a 12 g/dia), para que tenha os benefícios dos prebióticos associado. A amostra A8 não apresentou concentração adequada para nenhum microrganismo. A amostra A9, apresentou concentração adequada de ambos os microrganismos quando ingerida de acordo com a indicação, de 6 a 12 g/dia, com contagem média $6 \log \text{UFC g}^{-1}$ na fase do duodeno durante o teste *in vitro*.

As únicas amostras que obtiveram concentração mínima de $8 \log \text{UFC g}^{-1}$ foram as A2, A3 e A7, entretanto, vale ressaltar que as análises foram realizadas a partir de 1 g de amostra, exceto para as amostras A6 e A7, que eram em cápsulas e a recomendação de ingestão diária era uma cápsula com peso de 916 e 335 mg, respectivamente. Sendo assim, as amostras A8, A9 e A10 precisam ser ajustadas em relação a quantidade indicada de ingestão diária para oferecer os benefícios do probiótico. Essas amostras aumentam, em média, 1 log

UFC g⁻¹ quando leva-se em consideração o consumo indicado de 7 g para a amostra A8, de 6 a 12 g para a A9 e de 200 g para o probiótico A10, mesmo assim, apenas a amostra A10 atinge uma concentração de 6 log UFC g⁻¹.

Hungri e Longo (2009) analisando a viabilidade de *Lactobacillus casei* em alimento probiótico encontraram contagens de microrganismos menores que a quantidade indicada na embalagem do produto, mas ainda dentro dos valores mínimos de viabilidade exigidos pela legislação.

As amostras apresentadas na forma de cápsulas (A6 e A7), continham acima de 6 log UFC g⁻¹. Porém, tiveram redução de 2 log UFC g⁻¹ do início até a chegada no duodeno, mostrando que a função da cápsula era de apenas armazenar o microrganismo, mas não de protegê-lo durante a ingestão. O pH baixo interfere na viabilidade das colônias probióticas reduzindo assim, a contagem das células viáveis de microrganismos (COOK; TZORTZIS; CHARALAMPOPOULOS; KHUTORYANSKIY, 2012).

As amostras A1, A2, A3, A6 e A7 apresentaram contagem inicial superior a 8 log UFC g⁻¹ para *Lactobacillus* sp., destas, as amostras A1, A2, A3, A6 e A7 apresentaram contagem superior a 6 log UFC g⁻¹ na etapa do duodeno, apresentando potencial probiótico. A amostra A9, que é recomendado o consumo de 6 - 12 g/dia para oferecer os benefícios probióticos, possui uma concentração de 6 log UFC g⁻¹ na quantidade indicada, atingindo assim, a recomendação probiótica. As amostras A4, A5 e A8 apresentaram concentração média de 3 log UFC g⁻¹ ao chegar na etapa do duodeno, não apresentando potencial probiótico. Na amostra A8 é indicado o consumo de 7 g/dia, porém atingiu a concentração máxima de 4 log UFC g⁻¹, sendo considerada insuficiente para potencial probiótico.

Quando analisadas as amostras contendo somente *Bifidobacterium* sp., a amostra A10 apresentou concentração superior a 7 log UFC g⁻¹ levando em consideração a quantidade

indicada para consumo diário, de 200 g/dia, sendo considerada probiótica. O probiótico A11 apresentou contagem média de 3 log UFC g⁻¹, não conferindo o benefício probiótico.

Estudos já demonstraram a eficácia terapêutica e profilática de probióticos específicos contra gastroenterite viral aguda, diarreia associada a antibióticos, infecção por *Clostridium difficile* e por *Helicobacter pylori*, doença intestinal inflamatória e síndrome do intestino irritado (GILL, 2003; OZOGUL; HAMED, 2016; SHORI, 2017). Os efeitos dos probióticos são cepa-dependentes, desse modo, cada cepa traz diferentes benefícios para a saúde, como melhora no metabolismo, na inflamação intestinal crônica, em desordens funcionais, em infecções e alergias (CHEN; CHEN, 2007; SHORI, 2017).

O trato gastrointestinal é uma das formas de acesso à patógenos, sendo que estes podem se instalar e colonizar as células e tecidos do hospedeiro se as defesas, como as bactérias probióticas, forem insuficientes (FERREIRA, 2009). Os probióticos podem inibir o crescimento de bactérias patogênicas no intestino por vários mecanismos, como a capacidade de sintetizar substâncias antibacterianas e inibir a adesão de bactérias patogênicas na superfície intestinal (FUNG et al., 2011).

Quando consumidos em quantidades adequadas, os probióticos apresentam diversos efeitos benéficos sobre o corpo humano através, principalmente, da manutenção da microflora intestinal normal, inibindo assim a adesão de bactérias patogênicas na mucosa intestinal, aumentando a imunidade, reduzindo os níveis de colesterol no sangue, protegendo contra doenças cardíacas, reduzindo a incidência de doenças urogenitais e respiratórias, prevenindo alguns tipos de câncer e agindo também no controle da obesidade (ROUXINOL-DIAS et al., 2016).

Os probióticos avaliados mostram a necessidade de serem implementadas tecnologias para manter a viabilidade probiótica dos microrganismos, para que possam atender as necessidades dos consumidores, bem como oferecer os benefícios esperados. Os resultados

mais insatisfatórios foram vistos nos probióticos adquiridos em farmácias de manipulação, que ainda são comercializados sem nenhuma indicação de preparo e consumo. Esses probióticos por não serem comercializados nas embalagens originais do fabricante, e sim na embalagem da farmácia que o revende, não apresentam data de fabricação, apenas prazo de validade, oferecendo uma informação superficial ao consumidor.

CONCLUSÃO

Das 11 amostras avaliadas, quatro não possuem potencial probiótico. Das quatro amostras adquiridas em farmácias convencionais, apenas uma (A8) não apresentou contagem satisfatória, porém duas (A8 e A9) não possuem a concentração indicada no rótulo. O processo de ativação dos microrganismos proporcionou uma concentração adequada, porém esses microrganismos (A1, A2 e A3) são indicados, especialmente, para uso em adição de produtos alimentícios. Apesar de algumas amostras serem simbióticas, não houve relação com a função de manter a viabilidade probiótica do produto. Fica evidente que os probióticos comercializados em farmácias de manipulação não apresentam potencial probiótico, nem se consumidos em uma porção de, por exemplo, 20 g/dia.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

Almeida, M. H. B.; Cruz, A. G.; Faria, J. A. F.; Moura, M. R. L.; Carvalho, L. M. J.; Freitas, M. C. J. (2009). Effect of the acai pulp on the sensorial attributes of probiotic yoghurts. *International Journal of Probiotics & Prebiotics*, v. 4, p. 41-44.

Almeida, M. H. B.; Zoellner, S. S.; Cruz, A. G.; Moura, M. R. L.; Carvalho, L. M. J.; Santana, A. S. (2008). Potentially probiotic acai yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, v. 61, p. 178-182.

Argyri, A. A. et al. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, v. 33, p. 282-291.

Brasil. (2002). 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 República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 09 de janeiro de 2002.

Brasil. (2008). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas para alimentos com alegações de propriedades funcionais e / ou de saúde, novos alimentos / ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Brasília.

Brasil. (2019). Guia nº 21/2019. Guia para instrução processual de petição para avaliação de probióticos para uso em alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, versão 1.

Brasil. (2018). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 241, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. *Diário Oficial da União* nº 144, de 27 de julho de 2018.

Brasil. (2018). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 243, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares. *Diário Oficial da União* nº 144, de 27 de julho de 2018.

Champagne, C. P. et al. (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food microbiology*, v.149, 185-193.

Chen, M. J.; Chen, K. N. (2007). Applications of probiotic encapsulation in dairy products. In: LAKKIS, J. M. (Ed.), *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*. Wiley-Blackwell, USA, pp. 83-107.

Chen, P., Zhang, Q., Dang, H., Liu, X., Tian, F., Zhao, J., Chen, Y., Zhang, H., Chen, W. (2014). Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and α -glucosidase inhibitory activity. *Food Control.*, 35, pp. 65-72

Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 162, n. 56-67.

FAO/WHO. (2006). *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. Canadá.

FAO/WHO. (2001). *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk live lactic acid bacteria* – Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, Córdoba, Argentina.

Fávaro-Trindade, C. S.; Grosso, C. R. F. (2002). 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*, Abingdon, v. 19, p. 485-494.

FDA. (2004). Food, Drug Administration. *Probiotics*. New York, 2004. Disponível em: <[http:// www.webdietitians.org/Public/GovernmentAffairs/92_adap1099.cfm](http://www.webdietitians.org/Public/GovernmentAffairs/92_adap1099.cfm) >. Acesso em 15 mar. 2019.

Ferreira, C. L. L. F. (2009). *Benefícios das culturas lácticas probióticas*. In: OLIVEIRA, M. (Ed.). *Tecnologia de Produtos Lácteos Funcionais*. São Paulo, SP: Atheneu, p. 213–234.

Flesch, A. G. T. et al. (2014). O uso terapêutico dos simbióticos. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, v.27, n. 3, p. 206-209.

Fung, W. Y. et al. (2011). Roles of probiotic on gut health. In: LIONG, M.-T. (Ed.). *Probiotics: Biology, Genetics and Health Aspects*. Microbiology Monographs. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, v. 21, p. 139–166.

Gbassi, G. K. et al. (2009). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 129, p. 103-105.

Gebara, C. et al. (2013). Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, Kidlington, v. 51, p. 872-878.

Gill, H. S. (2003). Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 17, n. 5, p. 755-773.

Hungri, T. D.; Longo, P. L. (2009). Viabilidade de *Lactobacillus casei* em alimento probiótico infantil relacionada a vida de prateleira. *Revista Saúde*, Guarulhos, v. 3, n. 3, p. 10-15.

Hur, S., Lim, B., Decker, E., McClements, D. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125, 1-12.

Khangwal, I., Shukla, P. (2019). Potential prebiotics and their transmission mechanisms: Recent approaches. *Journal of Food and Drug Analysis*. Available online.

Le Leu, R. K.; Hu, Y.; Brown, I. L.; Woodman, R. J.; Young, G. P. (2009). Symbiotic intervention of *Bifidobacterium lactis* and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats. *Carcinogenesis*, v. 31, n. 2, p. 246-251.

Lee, Y. K.; Salminen, S. (2009). Handbook of probiotics and prebiotics. 2 ed. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons. p. 443.

Lenhart, N. K., Cornele, J. (2009). Simbiotic Relationships: Effectively Managing a Simulation Continuum to Bring Nurses to Life. *Clinical Simulation in Nursing*, v. 5, n. 3, p. 144-145.

Li, X.Y. et al. (2011). Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Carbohydrate Polymers*, v. 83, n. 4, p. 1479 – 1485.

Liserre, A. M.; Ré, M. I.; Franco, B. D. M. G. (2007). Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Biotechnology*, New York, v. 21, p. 1-16.

Madureira, A. R. et al. (2011). Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, v. 44, p. 465–470.

Martín, M. J.; Lara-Villoslada, F.; Ruiz, M. A.; Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 27, p. 15-25.

Nazzaro, F. et al. (2009). Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, v.1, n.3, p. 319-323.

Nobre, C., Nascimento, A. K. C., Silva, S. P. et al. (2019). Process development for the production of prebiotic fructo-oligosaccharides by *penicillium citreonigrum*. *Bioresource Technology*, v. 282, p. 464-474.

Ozogul, F.; Hamed, I. (2016). Lactic acid bacteria: *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus acidophilus*. *Reference Module in Food Science*.

Picot, A.; Lacroix, C. (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. *International Dairy Journal*, Amsterdam, v. 14, p. 505-515.

Ranadheera, R. D. C. S.; Baines, S. K.; Adams, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, Kidlington, v. 43, p. 1-7.

Rouxinol-Dias, A. L. et al. (2016). Probiotics for the control of obesity – Its effect on weight change. *Porto Biomedical Journal*, v. 1, n. 1, p.12-24.

Santos, J. P. V.; Goulart, S. M.; Ramos, A. M. (2012). Influência da adição de inulina nas características físico-químicas e sensoriais do doce de leite cremoso. *Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”*, v. 67, n. 388, p. 35-40, Set./Out.

Shindea, T.; Vemurib, R.; Shastrib, M. D.; Pererab, A. P.; Tristramb, S.; Stanleya, R.; Erib, R. (2019). Probiotic *Bacillus coagulans* MTCC 5856 spores exhibit excellent in-vitro functional efficacy in simulated gastric survival, mucosal adhesion and immunomodulation. *Journal of Functional Foods*, v. 52, p. 100–108.

Shori, A. B. (2017). Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit. *Journal of Biosciences*, v.24, n.1, p. 1-5.

Simeoni, C. P. S.; Etchepare, M. A.; Menezes, C. R.; Fries, L. M.; Menezes, M. F. C.; Stefanello, F. S. (2014). Microencapsulação de probióticos: inovação tecnológica na indústria de alimentos. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental – REGET*, v. 18, p. 66-75.

Sohail, A. et al. (2011). 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.

Tripathi, M. K.; Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, v. 9, n, p. 225-241.

Worthley, D. L.; Le Leu, R. K.; Whitehall, V. L.; Conlon, M.; Christophersen, C.; Belobrajdic, D.; Mallit, K. A.; Hu, Y.; Irahara, N.; Ogino, S.; Legget, B. A.; Young, G. P. (2009). A human double-blind, placebo-controlled, crossover trial of prebiotic, probiotic, and symbiotic, supplementation: effects on luminal, inflammatory, epigenetic, and epithelial biomarkers of colorectal cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 90, n. 3, p. 578-586.

Zhang, Z., Wu, X., Zhang, G., Ma, X., He, D. (2019). Functional food development: Insights from TRP channels. *Journal of Functional Foods*, v. 56, p. 384-394.

Zoellner, S. S.; Cruz, A. G.; Faria, J. A. F.; Bolini, H. M. A.; Moura, M. R. L.; Carvalho, L. M. J.; Santana, A. S. (2009). Whey beverage with acai pulp as food carrier of probiotic bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 64, p.165-169.

Tabela 1 – Probióticos comerciais utilizados para a avaliação da viabilidade durante a simulação gastrointestinal.

Amostra	Composição*	Concentração*	Apresentação*	Indicação de armazenamento*	Indicação de preparo*	Indicação de consumo*	Tempo de validade*
A1	<i>L. rhamnosus</i>	NE	Liofilizado	5±3 °C	Ativação	NE	12 meses
A2	<i>L. acidophilus</i> LA-14	NE	Liofilizado	5±3 °C	Ativação	NE	12 meses
A3	<i>L. acidophilus</i> LA-14	NE	Liofilizado	4 °C	Ativação	NE	12 meses
A4	<i>L. acidophilus</i> LA-14	NE	Liofilizado	Refrigeração	Diluir em água	NE	NE
A5	<i>L. acidophilus</i> LA-14	NE	Liofilizado	Refrigeração	Diluir em água	NE	NE
A6	<i>L. acidophilus</i> LA 14	10 ⁹ UFC	Cápsula	Temperatura ambiente	PC	1 cápsula (916mg)/dia	NE
A7	<i>L. acidophilus</i> NCFM <i>L. paracasei</i> Lpc-37 <i>B. lactis</i> Bi-07 <i>B. lactis</i> BI-04 <i>B. bifidum</i> Bb-02	2x10 ¹⁰ UFC	Cápsula	Temperatura ambiente	PC	1-2 cápsula (335mg)/dia	24 meses
A8	Frutooligossacarídeo <i>L. acidophilus</i> SD 5221 <i>L. rhamnosus</i> SD 5217 <i>B. bifidum</i> SD 6576	5,5 g 10 ⁹ UFC 10 ⁹ UFC 10 ⁹ UFC	Liofilizado	Temperatura ambiente	Diluir em água	1 sachê (7g)/dia	24 meses
A9	Frutooligossacarídeo <i>L. acidophilus</i> SD 5221 <i>L. rhamnosus</i> SD 5675 <i>L. paracasei</i> SD 5275 <i>B. lactis</i> SD 5674	6,0 g 10 ⁹ UFC 10 ⁹ UFC 10 ⁹ UFC 10 ⁹ UFC	Liofilizado	Temperatura ambiente	Diluir em água	1-2 sachês (6-12g)/dia	24 meses
A10	<i>B. animalis</i> CNCM I-2494	NE	Líquido	1 – 10 °C	PC	2 shot (200g)/dia	45 dias
A11	<i>B. bifidum</i> LA-14	NE	Liofilizado	Refrigeração	Diluir em água	NE	NE

* Informação conforme descrito na embalagem. NE = não estabelecido. PC = pronto para o consumo.

Fonte: Autora.

Tabela 2 – Viabilidade probiótica dos microrganismos comerciais antes e após a simulação gastrointestinal. Análise realizada em 1g de amostra. Resultados expresso em log UFC g⁻¹.

Amostra	<i>Lactobacillus sp.</i>			
	Inicial	Estômago	Duodeno	Íleo
A1	8,2±0,1 ^a	8,0±0,1 ^a	7,9±0,1 ^a	7,7±0,1 ^a
A2	9,8±0,2 ^a	8,7±0,1 ^b	8,0±0,1 ^b	8,1±0,1 ^b
A3	10,5±0,1 ^a	9,4±0,2 ^b	9,3±0,1 ^b	9,0±0,1 ^b
A4	5,8±0,1 ^a	3,2±0,1 ^b	3,0±0,2 ^b	3,0±0,1 ^b
A5	4,8±0,2 ^a	3,6±0,1 ^b	3,3±0,1 ^b	3,2±0,1 ^b
A6	9,9±0,1 ^a	7,1±0,1 ^b	7,1±0,3 ^b	7,0±0,1 ^b
A7	10,7±0,2 ^a	9,4±0,1 ^b	8,3±0,1 ^c	8,6±0,1 ^c
A8	6,5±0,2 ^a	4,4±0,2 ^b	3,3±0,1 ^b	2,9±0,1 ^c
A9	7,3±0,1 ^a	5,8±0,2 ^b	5,8±0,2 ^b	5,8±0,1 ^b

	<i>Bifidobacterium sp.</i>			
	Inicial	Estômago	Duodeno	Íleo
A7	10,5±0,2 ^a	9,2±0,2 ^b	7,3±0,1 ^c	7,2±0,1 ^c
A8	7,7±0,1 ^a	3,3±0,1 ^b	3,6±0,1 ^b	3,5±0,1 ^b
A9	5,6±0,2 ^a	5,4±0,1 ^a	5,2±0,1 ^a	5,1±0,2 ^a
A10	8,0±0,1 ^a	6,7±0,2 ^b	6,9±0,1 ^b	6,9±0,2 ^b
A11	4,3±0,1 ^a	3,5±0,1 ^b	3,3±0,2 ^b	3,3±0,1 ^b

Médias da experimentação em triplicata seguidas ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha representam

que houve diferença estatística significativa entre os resultados ($p < 0,05$).

3.7 DOCUMENTO DO PEDIDO DE PATENTE

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Obtenção da Manteiga
Utilidade (54): CAPSULA, USO DA CAPSULA, MANTEIGA E PROCESSO DE OBTENÇÃO DA MANTEIGA

Resumo: A presente invenção descreve uma cápsula que compreende bactérias probióticas e pode ser utilizada para obtenção de produtos alimentícios funcionais. Especificamente, a presente invenção revela uma manteiga compreendendo a cápsula probiótica e o processo de obtenção dessa manteiga. A presente invenção se situa nos campos da engenharia de alimentos, nutrição, saúde, mais especificamente no ramo da tecnologia de alimentos.

Figura e publicar: 8



01/03/2019 870190021498



17-40
294.091.61807549118

Pedido nacional de invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 004349 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 95591764000105

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Avenida Roraima, nº 1000, Cidade Universitária - Bairro Camobi

Cidade: Santa Maria

Estado: RS

CEP: 97105-900

País: Brasil

Telefone: (55) 3220-8887

Fax:

Email: agfitec:pi@ufsm.br

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 01/03/2019 às 17:40, Petição 870190021498

Petição 870190021498, de 01/03/2019, pág. 1/45

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 01/03/2019 às 17:40, Petição 870190021498

Petição 870190021498, de 01/03/2019, pág. 2/45

4 DISCUSSÃO

As fábricas de laticínios produzem distintas manteigas comerciais, sendo elas de primeira qualidade, de segunda qualidade, extra, comum, *ghee*, *light*, e ainda podem ser com sal ou sem sal. O mercado está aberto para indústrias nacionais, de diversos estados, e estrangeiras, como Argentina, Itália e França. Ao serem analisadas quanto aos parâmetros de qualidade exigidos pela legislação brasileira, Portaria 146/1996 (BRASIL, 1996), verificou-se que parte dessas manteigas estão fora das exigências, e mesmo assim estão no mercado, sendo comercializadas.

A partir desse problema encontrado, surge o questionamento sobre a falha na fiscalização desses produtos e também a possibilidade de alteração da legislação, visto que essas manteigas não se encaixam em alguns parâmetros legais, porém estes não afetam a qualidade do produto, sendo manteigas aptas para o consumo humano. Essa sugestão de alteração na legislação refere-se ao fato de que o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Manteiga não permite a adição de ingredientes na manteiga, além de sal, cúrcuma, bicarbonato de sódio (quando necessário) e bactérias para fermentação da nata (BRASIL, 1996). Entretanto, estudos têm trazido cada vez mais a sugestão de adição de componentes benéficos para a saúde do consumidor, como especiarias, óleos essenciais, bactérias probióticas (RICHARDS; GIOIELLI, 2016; WILBEY, 2009; ERKAYA et al., 2015) entre outros, atualmente não permitidos de serem adicionados em manteiga, conforme a regulamentação brasileira.

Neste contexto, surgiu a possibilidade do desenvolvimento de manteiga probiótica com sal hipossódico, para atender a demanda dos consumidores pela busca por alimentos funcionais. A análise sensorial realizada anteriormente a produção da manteiga probiótica com sal hipossódico, serviu para verificar a aceitação da presença das partículas na manteiga.

Os 180 provadores não treinados que participaram da análise sensorial avaliaram uma manteiga tradicional e uma manteiga contendo as partículas que seriam recheadas com microrganismos probióticos. A partir desses resultados, foi possível observar que a manteiga contendo cápsulas probióticas foi bem aceita entre os provadores, sendo inclusive, favorita entre as duas amostras. A partir dos resultados, que evidenciaram a aceitação pelos consumidores das cápsulas na manteiga, estudos foram iniciados para a produção de cápsulas probióticas e adição em manteiga.

Com base no estudo inicial, realizou-se a encapsulação de bactérias probióticas pela técnica de gelificação iônica – extrusão. Diversos métodos e materiais têm sido investigados

para produção de partículas, tal como, a extrusão utilizando polissacarídeos naturais como o alginato (PATIL et al., 2010). A extrusão é uma técnica de encapsulação simples, rápida, de fácil execução e de baixo custo (SHORI, 2017; MARTÍN et al., 2015; CAVALHEIRO et al., 2015) que ocorre quando uma solução polimérica é gotejada em uma solução iônica, geralmente cloreto de cálcio, que em concentrações adequadas irá formar instantaneamente partículas tridimensionais de diferentes formas e tamanhos, que englobam o núcleo encapsulado (DE VOS et al., 2010). Foi escolhida essa técnica por ser a mais utilizada para obtenção de cápsulas de alginato, por sua uniformidade de conformação e tamanho das partículas (PASIN; AZÓN; GARRIGA, 2012).

A encapsulação é definida como uma tecnologia para proteção de ingredientes sensíveis, incluindo (sólido, líquido ou gasoso) dentro de diversas matrizes desde que os ingredientes sejam aprisionados ou cercados pelas matrizes protetoras (DE PRISCO; MAURIELLO, 2016). A encapsulação tem como objetivo primordial proteger o seu conteúdo, ou seja, o material a ser encapsulado, por meio de um material encapsulante, que neste estudo foram bactérias probióticas. A técnica de encapsulação por extrusão, a partir do uso de alginato de sódio como encapsulante e cloreto de cálcio, se mostrou eficiente na proteção dos microrganismos para adição em manteiga.

Estudos sobre encapsulação relatam que a principal vantagem em produzir cápsulas maiores é a elevada eficiência de encapsulação que se obtém (CHEN et al., 2017). Geralmente, a eficiência de encapsulação ao utilizar essa técnica é próxima de 100% (URBANSKA et al., 2007; HOLKEM et al., 2016). Além disso, a microencapsulação apresenta um custo bastante elevado, diferente da encapsulação (partículas maiores) que se torna uma alternativa tecnológica viável por ser considerada fácil e eficiente, além de haver menor desperdício de material bacteriano (MARTÍN et al., 2015).

Os testes iniciais de encapsulação e viabilidade probiótica *in vitro* e comportamento térmico, utilizando *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. bifidum*, mostraram que o *L. acidophilus* foi o microrganismo que melhor se adaptou às condições testadas. A produção de cápsula com tamanho macroscópico, em torno de 2000 µm, mostrou-se satisfatória na encapsulação, atingindo eficiência de encapsulação pouco maior que 100%, conferindo esse resultado ao fato de que cápsulas maiores possuem maior capacidade de concentração do teor de células de probióticos em seu núcleo. Zhao et al. (2018) encontraram eficiência de encapsulação de 112% ao encapsular bactérias probióticas.

O *L. acidophilus* foi o microrganismo que apresentou resultados mais satisfatórios, portanto foi testado a secagem das cápsulas produzidas com ele em liofilizador. Entretanto

não foram obtidos resultados positivos, mostrando que a cápsula úmida mantém a viabilidade do probiótico sem necessitar ser submetida a nenhum processo de secagem após a encapsulação.

A microscopia é uma ferramenta importante para analisar a produção e as características das cápsulas, como estrutura externa e arranjo molecular (ALLAN-WOJTAS et al., 2008; YONEKURA; SUN; SOUKOULIS; FISK, 2014). Para avaliar o recheio e a presença dos microrganismos no interior das cápsulas úmidas produzidas foram submetidas a análise morfológica, em microscópio óptico e as cápsulas secas foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura. Nas duas análises foi possível verificar a presença de microrganismos no núcleo das cápsulas e a camada protetora formada pelo alginato de sódio.

A observação microscópica das partículas pode determinar a morfologia externa, a estrutura interna, o tamanho, a superfície e a distribuição de recheio (microrganismos) na matriz encapsulante. Segundo Iyer e Kailasapathy (2005) a forma das cápsulas de alginato de sódio desenvolvidas por extrusão são uniformemente esféricas, com as bactérias distribuídas aleatoriamente na matriz de alginato. A análise das cápsulas por microscopia óptica revelou partículas esféricas, com tamanho uniforme, de superfície lisa e com recheio distribuído por toda a matriz, semelhante aos resultados encontrados por outros pesquisadores (SIMEONI, 2015; BOSCARIOLI, 2010; ETCHEPARE, 2014; SANTOS, 2013).

Durante as análises para avaliar a viabilidade dos microrganismos encapsulados e aplicados na manteiga, foi possível verificar que a cápsula protegeu os microrganismos durante o período de estocagem em refrigeração e nos testes *in vitro* que simularam a passagem pelo trato gastrointestinal, quando comparados com os microrganismos livres.

As manteigas deste estudo foram produzidas a partir da gordura do leite de vacas da raça Jersey. A adição do sal hipossódico foi utilizada com o intuito de contribuir para a obtenção de um alimento funcional, juntamente com a adição das cápsulas probióticas, sendo um produto hipossódico e probiótico. O sal hipossódico é um produto desenvolvido a partir da mistura de cloreto de sódio com cloreto de potássio, de modo que a mistura final mantenha poder salgante semelhante ao do sal de mesa fornecendo, no máximo, 50% do teor de sódio contido na mesma quantidade de cloreto de sódio (BRASIL, 1995), conferindo resultados satisfatórios na adição em manteigas. Estudos têm abordado a importância sobre a redução do sal comum e a adição de sal hipossódico em alimentos (ALBUQUERQUE et al., 2018; BOBOWSKI; RENDAHL; VICKERS, 2015).

Entre os tratamentos de manteigas desenvolvidos, os que possuíam adição de 10% de cápsulas (T5 e T6) apresentaram os melhores resultados quanto a concentração inicial de

probióticos e a viabilidade durante o período de armazenamento e na simulação gastrointestinal. Resultados satisfatórios também foram encontrados nas formulações com 5% de cápsulas (T3 e T4).

A análise de textura mostrou que a adição das cápsulas confere um produto de maior firmeza em relação a manteiga padrão, porém, vale ressaltar que a manteiga base era a mesma dos tratamentos, logo compreende-se que o *probe* ao encontrar com as cápsulas durante a análise aponta como um produto mais firme.

Na avaliação do comportamento térmico das cápsulas e manteigas, pode-se verificar que o *L. acidophilus* foi o microrganismo que mostrou melhor viabilidade frente às condições testadas. Quando adicionado na manteiga, verificou-se que a adição de 10% de cápsulas mostrou melhor viabilidade. Os resultados mostraram que o congelamento mantém a viabilidade probiótica, porém o processo de descongelamento contribui para a desestruturação das cápsulas, pois as cápsulas ao serem descongeladas sofrem exsudação, havendo a saída da água contida em seu interior, para o exterior.

As manteigas quando submetidas ao aquecimento mostraram não ser possível proteger os microrganismos do calor em uma concentração adequada, o que já era esperado. O comportamento térmico juntamente com a análise de DSC mostrou que a manteiga chega ao estado líquido por volta dos 37 °C e que as cápsulas permanecem intactas, conseguindo proteger células microbianas viáveis até os 75 °C, porém, em concentração insuficiente para conferir o benefício probiótico. Ainda, existem cápsulas inteiras, havendo desestruturação total somente por volta dos 100 °C.

Os testes *in vitro* mais utilizados para a avaliação de probióticos em alimentos são as análises de resistência à acidez gástrica e aos sais biliares, baseados em estudos de sobrevivência e desenvolvimento, pois a tolerância à bile é considerada como uma característica importante de cepas de *Lactobacillus* sp., por exemplo, o que lhes permite sobreviver, multiplicar-se e exercer a sua ação no trânsito gastrointestinal (FAO/WHO, 2006; ARGYRI et al., 2013). As manteigas adicionadas de cápsulas probióticas conseguiram comprovar os benefícios por meio das análises de vida de prateleira e viabilidade probiótica, testes *in vitro* da simulação gastrointestinal e avaliação do comportamento térmico.

Existem muitos estudos que comprovam a eficiência *in vitro* dos microrganismos encapsulados (SHORI, 2017; ARSLAN; ERBAS, 2017; RATHORE; MAHENDRAKUMAR; CELINE, 2013; CHÁVARRI et al., 2010), porém são poucos os estudos *in vivo* realizados para testar o efeito benéfico dos probióticos encapsulados, mesmo embora esses estudos mostrem resultados promissores, eles só foram realizados em animais. Martín et al. (2015) e

Shori (2017) expõe a importância de serem conduzidos ensaios *in vivo* clínicos, envolvendo um grande número de pacientes, para obter evidências científicas definitivas do papel preventivo e curativo dos probióticos encapsulados na prática médica. Além disso, percebe-se que ainda faltam informações sobre indicações corretas em termos de quantidade de bactérias e sua viabilidade, sendo necessário haver uma padronização para a administração de probióticos encapsulados por meio de resultados homogêneos e comparáveis (MARTÍN et al., 2015; DE PRISCO, et al., 2016).

Após conhecer as dificuldades em manter a viabilidade probiótica em alimentos, foi estudado a viabilidade durante a simulação gastrointestinal *in vitro* de probióticos comerciais encontrados em farmácias de manipulação, farmácias convencionais e indústrias especializadas, todos comercializados livremente. A partir dos resultados encontrados foi possível observar que os probióticos comercializados em farmácias de manipulação não conferem os benefícios alegados, não oferecendo ainda instruções de modo de preparo e indicação de consumo para os consumidores.

Entre os probióticos comercializados por empresas especializadas, todos possuem uma viabilidade adequada, visto que a indicação é adicionar em produtos. Os produtos probióticos adquiridos em farmácias convencionais ou supermercados, apenas um, dos cinco avaliados, não apresentou viabilidade satisfatória, sendo inferior a $6 \log \text{UFC g}^{-1}$ desde a concentração inicial até ao final da simulação gastrointestinal.

A manteiga é um alimento que possui vida de prateleira média de seis meses, e a manteiga probiótica, por haver a adição de cápsulas úmidas, possui vida de prateleira de 45 dias, pois a partir desse período foi verificado o crescimento de bolores e a inviabilidade dos probióticos. Logo, acredita-se que a comercialização da manteiga probiótica em embalagem menor, em torno de 100 g, viabilizaria o valor de compra para o consumidor e ainda estimula o consumo dentro do prazo viável dos microrganismos.

Por fim, após inúmeros testes para obtenção de uma manteiga funcional adicionada de probiótico encapsulado e sal hipossódico, este estudo resultou em um depósito de pedido de patente junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) sob o nº BR 10 2019 004349-0 no dia 01/03/2019, intitulado “Cápsula, uso da cápsula, manteiga e processo de obtenção da manteiga”.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados foi possível concluir que é necessária uma revisão na legislação brasileira de manteigas, alterando os ingredientes permitidos na adição do produto, para que então possam ser produzidas e comercializadas manteigas funcionais contendo probióticos encapsulados.

A técnica de encapsulação por extrusão atingiu os objetivos esperados quanto ao proteger os microrganismos de condições extrínsecas, mantendo a sua viabilidade durante um período maior de armazenamento e pelas condições simuladas na passagem pelo trato gastrointestinal. O *Lactobacillus acidophilus* foi o microrganismo que apresentou melhores resultados de encapsulação e viabilidade.

As manteigas produzidas nesse estudo apresentam cápsulas probióticas visíveis, porém as características específicas de composição físico-química, perfil lipídico e cor foram semelhantes às encontradas por outros pesquisadores, ou seja, a adição das cápsulas provocou poucas alterações em sua composição físico-química. A manteiga com cápsula úmida se mostrou mais firme e as cápsulas adicionadas na manteiga se solubilizam apenas em temperaturas próximas a 100 °C. Os microrganismos encapsulados não resistem a temperatura de aquecimento acima de 50 °C. A manteiga probiótica possui vida de prateleira de 45 dias se armazenada em temperatura máxima de 5 °C.

REFERÊNCIAS

ABIA. Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação. **Indústrias retiram mais de 17 mil toneladas de sódio dos alimentos.** 2017. Disponível em: https://www.abia.org.br/vsn/tmp_2.aspx?id=341 Acesso: em 06 de maio de 2019.

ABIA. Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação. **Relatório anual 2010.** Disponível em: <http://www.abia.org.br/anexos/RelatorioAnualABIA2010.pdf>. Acesso: outubro de 2015.

ALBUQUERQUE, T. G., SANTOS, J., SILVA, M. A., M. OLIVEIRA, B. P. P., COSTA, H. S. An update on processed foods: Relationship between salt, saturated and *trans* fatty acids contents. **Food Chemistry**, v. 267, p. 75-82, 2018.

ALLAN-WOJTAS, P.; FORNEY, C. F.; MOYLS, L.; MOREAU, D. L. Structure and gas transmission characteristics of microperforations in plastic films. **Packaging Technology and Science**, v. 21, p. 217-229, 2008.

ALO GLU, H., ONER, Z. Assimilation of cholesterol in broth, cream, and butter by probiotic bacteria. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, p. 709 - 713, 2006.

ALVES, L.L. et al. Aceitação sensorial e caracterização de frozen yogurt de leite de cabra com adição de cultura probiótica e prebiótico. **Ciência Rural**, v. 39, p. 2595-2600, 2009.

ALVES, L.L. et al. Cream cheese as a symbiotic food carrier using *Bifidobacterium animalis* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* La-5 and inulin. **International Journal of Dairy Technology**, v. 66, p. 63-69, 2013.

ALVES, L.L. et al. Inulin and probiotic concentration effects on fatty and linoleic conjugated acids in cream cheese. **European Food Research & Technology**, v. 233, p. 667-675, 2011.

ARGYRI, A. A. et al. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. **Food Microbiology**. v. 33, p. 282-291, 2013.

ARSLAN-TONTUL, S., ERBAS, M. Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 160-169, 2017.

ÁVILA, M. **A importância dos sais minerais**. Disponível em <http://www.endocrinologia.com.br/nutricao/a-importancia-dossais-minerais.php>. Acesso em 13 de outubro de 2016.

BAJPAI, S. K.; TANKHIWALE, R. Investigation of water uptake behavior and stability of calcium alginate/chitosan bi-polymeric beads. **Reactive and Functional Polymers**, v. 66, p. 645-658, 2006.

BARROS, R. R. **Consumo de alimentos industrializados e fatores associados em adultos e idosos residentes no município de São Paulo**. 2008. Dissertação. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

BAUMAN, D. E. et al. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. **Proceedings of the American Society of Animal Science**, v.41, p. 215-227, 2001.

BERMUDEZ-BRITO, M. et al. Probiotic mechanisms of action. **Annals of Nutrition and Metabolism**. Basel, v.61, p. 161-174, 2012.

BOBOWSKI, N., RENDAHL, A., VICKERS, Z. A longitudinal comparison of two salt reduction strategies: Acceptability of a low sodium food depends on the consumer. **Food Quality and Preference**, v. 40, p. 270-278, 2015.

BONOMI, E. C.; LUCCAS, V.; KIECKBUSCH, T. G. Characterization of the stearin obtained by thermal fractionation of anhydrous milk fat. **Procedia Engineering**, v. 42, p. 918-923, 2012.

BOSCARIOLI, M. P. M. **Influência de prebióticos na encapsulação de bactérias probióticas adicionadas em sorvete**. 2010. Dissertação (Mestrado) da Escola de Engenharia Mauá - Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia.

BRASIL. 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 República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 09 jan. 2002.

BRASIL. Resolução nº 359 de 23 de dezembro de 2003. Regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. Ministério da Saúde. **Diário Oficial da União**, 17 de dezembro de 2003. Brasília, 2003a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. **Diário Oficial da União**, 23 de dezembro de 2003, Brasília, 2003b.

BRASIL. Resolução RDC nº 323 de 10 de novembro de 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Aprova o regulamento técnico de registro, alterações e revalidação de registro dos medicamentos probióticos. **Diário Oficial da União**, 12 de novembro de 2003, Brasília, 2003c.

BRASIL. RDC nº 04 de 28 de junho de 2000. Institui o produto denominado ‘Manteiga Comum’, para comercialização exclusiva no território nacional. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, 05 de julho de 2000, Brasília, 2000.

BRASIL. Probióticos: Construção da Lista de Linhagens Probióticas. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2017. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/3845226/0/An%C3%A1lise+das+Linhagens+de+Probi%C3%B3ticos__23042018.pdf/6e37da13-2151-4330-85b0-0f449dbb0e95 Acesso em: 10 de janeiro de 2018.

BRASIL. Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas para alimentos com alegações de propriedades funcionais e / ou de saúde, novos alimentos / ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Brasília, 2008.

BRASIL. **Decreto nº 9.013**, de 29 de março de 2017. Dispõe sobre o Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (RIISPOA). 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 54, de 4 julho de 1995. Aprovar o Padrão de Identidade e Qualidade para Sal Hipossódico. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 5 jul. 1995.

BULDO, P.; WIKING, L. Butter: Properties and Analysis. Reference Module in Food Science. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 535-541, 2016.

BULDO, P.; KIRKENSGAARD, J. J. K.; WIKING, L. Crystallization mechanisms in cream during ripening and initial butter churning. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 6782-6791, 2013.

BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications, **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 4, p. 467-483, 2011.

CAMPBELL, N. R. C.; LEGOWSKI, B.; LEGETIC, B. Mobilizing the Americas for dietary salt reduction. **The Lancet**, v. 377, p. 793-795, 2011.

CARVALHO, C. B. et al. Análise sensorial de carnes bovinas e de frango com tempero completo hipossódico. **Ciência Biológica da Saúde**, v. 15, n. 3, p. 215-218, 2013.

CAVALHEIRO, C. P. et al. Encapsulação: alternativa para a aplicação de microrganismos probióticos em alimentos termicamente processados. **Ciência e Natura**, Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, v. 37, p. 65 – 74, 2015.

CHAMPAGNE, C. P. et al. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food microbiology**, v. 149, 185-193, 2011.

CHAMPAGNE, C. P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 184- 190, 2007.

CHAN, E. S.; LEE, B. B.; RAVINDRA, P.; PONCELET, D. Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 338, n. 1, p. 63-72, 2010.

CHÁVARRI, M. et al. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, p. 185-189, 2010.

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

CLAES, I. J. J.; VARGAS GARCÍA, C. E.; LEBEER, S. Novel opportunities for the exploitation of host–microbiome interactions in the intestine. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 32, p. 28-34, 2015.

CODEX ALIMENTARIUS. **Codex Standard for Butter**. Codex Standard 256-2007. Adopted in 1971. Revision 2007. Amendment 2007.

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

CORONA-HERNANDEZ, R. I. et al. Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 6, p. 614-628, 2013.

COSTA, E. N. **Influência do Tratamento Térmico Sobre os Ácidos Graxos em Leite Bovino**. 2011. 47f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

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

DE VOS, P.; FAAS, M. M.; SPASOJEVIC, M.; SIKKEMA, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 4, p. 292–302, 2010.

DRAGET, K. I. Alginates. In: **Handbook of hydrocolloids**. Cambridge, Inglaterra: Woodhead Publishing Limited, p. 379-395, 2007.

DREHMER, M. et al. Total and full-fat, but not low-fat, dairy product intakes are inversely associated with metabolic syndrome in adults, **Journal of Nutrition**, v.146, n. 1, p.81-89, 2015.

DUNNE, C.; O'MAHONY, L.; MURPHY, L.; THORNTON, G.; MORRISSEY, D.; O'HALLORAN, S.; FEENEY, M.; FLYNN, S.; FITZGERALD, G.; DALY, C.; KIELY, B.; O'SULLIVAN, G. C.; SHANAHAN, F.; COLLINS, J. K. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 386-92, 2001.

ERKAYA, T., ÜRKEK, B., DO GRU, Ü., ÇETIN, B., SENGÜL, M. Probiotic butter: Stability, free fatty acid composition and some quality parameters during refrigerated storage. **International Dairy Journal**, v. 49, p. 102-110, 2015.

ETCHEPARE, M. A. **Produção, caracterização e viabilidade de micropartículas com *Lactobacillus acidophilus* obtidas por gelificação iônica**. 2014. 120 p. Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. **Milk and dairy products in human nutrition**. 2013. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/018/i3396e/i3396e.pdf>. Acesso em 24/02/2015.

FAO/WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. **Health and Nutritional properties of alginate in food**. 2002. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/006/y4765e/y4765e08.htm>. Acesso em 23/03/2019.

FAO/WHO. **Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk live lactic acid bacteria** – Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, Córdoba, Argentina. 2001.

FAO/WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. Canadá, 2006.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; HEINEMANN, R. J. B.; PEDROSO, D. L. Review: developments in probiotic encapsulation. **CABI Review: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 6, p. 1-8, 2011.

FRIGHETTO, J. M. et al. Influência da adição de beta-galactosidase nas características físico químicas do leite e na cinética de fermentação de iogurte. **Revista Indústria de Laticínios**, v. 15, p. 90-93, 2011.

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

GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; SHAH, N. P. Probiotic dairy products as functional foods. **Food Science and Technology**, v. 9, n. 5, p. 455-470, 2010.

GURSOY, O. et al. Conjugated linoleic acid (CLA) content of most popular Turkish hard and soft cheeses. **Milchwissenschaft**, v. 58, n. 11-12, p. 622-623, 2003.

HE, F. J.; MACGREGOR, G. A. Reducing Population Salt Intake Worldwide: From Evidence to Implementation. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v.52, p. 363-382, 2010.

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

HILL, C. et al. Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.11, p. 506-514, 2014.

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

HOLKEM, A. T.; RADDATZ, G. C.; NUNES, G. L. et al. Development and characterization of alginate microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 produced by emulsification/internal gelation followed by freeze drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 302-308, 2016.

HOMAYOUNI, A.; AZIZI, A.; EHSANI, M. R.; YARMAND, M. S.; RAZAVI, S. H. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. **Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 50-55, 2008.

HUANG, S.; CAUTY, C.; DOLIVET, A.; LE LOIR, Y.; CHEN, X. D.; SCHUCK, P.; JEANTET, R. Double use of highly concentrated sweet whey to improve the biomass production and viability of spray-dried probiotic bacteria. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 453-463, 2016.

HUI, Y. H. **Bailey's industrial oil and fat products**. 5^a ed. New York: Wiley, v 2: 125-58, 2005.

HUPPERTZ, T.; KELLY, A. L.; FOX, P. F. **Milk lipids – composition, origin and properties.** Dairy Fats and Related Products. Editora A.Y. Tamime, Wiley-Blackwell, Oxford, p. 1-27, 2009.

HUTH, P. J.; PARK, K. M. Influência do consumo de produtos lácteos e gordura de leite no risco de doença cardiovascular: uma revisão das evidências. **Avanços na Nutrição**, v.3, p. 266 – 285, 2012.

IGNÁCIO, A, F; RODRIGUES, J, T, D; NIIZU, P, Y; CHANG, Y, K. Efeito da Substituição de Cloreto de Sódio por Cloreto de Potássio em Pão Francês. **Brazilian Journal Food Technology**, v.16, n.1, 2013.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Manteiga e Margarina – teor de gordura e colesterol em alimentos.** Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/teorGordura7.asp>. Acesso em 13/03/2016.

IYER, C.; KAILASAPATHY, K. Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt. **Journal of Food Science**, v.70, p.18-23, 2005.

KAILASAPATHY, K. Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 3, p. 39-48, 2002.

KAILASAPATHY, K.; RYBKA, S. *L.acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* – their therapeutic potential and survival in yoghurt. **Australian Journal Dairy Technology**, v. 52, p. 28-35, 1997.

KAILASAPATHY, K. Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. **Revisões da CAB: Perspectivas na Agricultura, Ciências Veterinárias, Nutrição e Recursos Naturais**, v. 4, n.33, p.1-19, 2009.

KONTKANEN, H.; ROKKA, S.; KEMPPINEN, A.; MIETTINEN, H.; HELLSTRÖM, J.; KRUUS, K.; KORHONEN, H. Enzymatic and physical modification of milk fat: A review. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 3-13, 2011.

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

KRATZ, M.; BAARS, T.; GUYENET, S. The relationship between high-fat dairy consumption and obesity, cardiocascular, adn metabolis disease. **European Journal of Nutrition**, v.52, p.1-24, 2013.

KRAUSE, A.; LOPETCHARAT, A.; DRAKE, M. Identification of the characteristics that drive consumer liking of butter. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.5, p. 2091-2102, 2007.

LEE, Y. K.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 241-245, 2009.

LOVERGROVE, J. A.; GIVENS, D. I. Produtos lácteos: Bom ou mau para doença cardiometabólica? **Nutrição Pesquisa Avaliações**, v. 29, n. 2, p. 249 – 267, 2016.

LUPO, P. B.; GONZÁLES, A. C.; MAESTRO, G. A. Microencapsulación con alginato em alimentos. Técnicas y aplicaciones. **Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v. 3, n. 1, p. 130-151, 2012.

MAESTRELLI, F. et al. Development of enteric-coated calcium pectinate microspheres intended for colonic drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 2, p. 508-518, 2008.

MARTÍN, M. J. et al. Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, p. 480-486, 2013.

MARTÍN, M. J.; LARA-VILLOSLADA, F.; RUIZ, M. A.; MORALES, M. E. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the

probiotic effects. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 27, p. 15-25, 2015.

MÉNDEZ-CID, F. J., CENTENO, J. A., MARTÍNEZ, S., CARBALLO, J. Changes in the chemical and physical characteristics of cow's milk butter during storage: Effects of temperature and addition of salt. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2017.

MENEZES, C.R.; DURRANT, L.R. Xilooligossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. **Ciência Rural**, v. 38, p. 587-592, 2008.

MIGUEL, A. C. M. G. **Efeitos da suplementação de manteiga e margarinas no metabolismo lipídico e inflamação de portadores de síndrome metabólica que mantiveram seus hábitos usuais de vida**. 2009. 142f. Tese (Doutor em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

MOFIDI, N. et al. Mass preparation and characterization of alginate microspheres. **Process Biochemistry**. v. 35, n. 9, p. 885-888, 2000.

MOHAMMADI, R., MORTAZAVIAN, A.M. Review article: Technological aspects of prebiotics in probiotic fermented milks (Review). **Food Reviews International**, v. 27, n.2, p. 192-212, 2011.

MOLINA, M. C. B.; CUNHA, R. S.; HERKENHOFF, L. F.; MILL, J. G. Hipertensão arterial e o consumo de sal em população urbana. **Revista Saúde Pública**, v. 37, n. 6, p. 743–750, 2003.

MORTENSEN, B. K. Butter and Other Milk Fat Products: Modified Butters. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, p. 500-505, 2011.

MORTENSEN, B. K. Production of yellow fats and spreads. AY Tamime (Ed.). **Dairy Fats and Related Products**. Wiley-Blackwell, Oxford, p. 167 – 194, 2009.

MORTENSEN, B. K.; DENMARK, T. Butter and other milk fat products. The product and its manufacture. J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney (Eds.), **Encyclopedia of dairy sciences**, 2nd ed., p. 492-499, 2011.

MORTENSEN, B. K. **Anhydrous Milk Fat/Butter Oil and Ghee**. Reference Module in Food Science, p. 515 – 521, 2016.

NILSON, E. A. F., JAIME, P. C., RESENDE, D. O. Iniciativas desenvolvidas no Brasil para a redução do teor de sódio em alimentos processados. **Revista Panamericana de Salud Publica**. v. 32, n. 4. 2012.

NULKAEKUL, S.; LENTON, D.; COOK, M. T.; KHUTORYANSKIY, V. V.; CHARALAMPOPOULOS, D. Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. **Carbohydr Polym**, v. 90, n. 3, p. 1281-1287, 2012.

ORDÓÑEZ, P. J. A. **Tecnologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

OZER, B.; KIRMACHI, A.; SENEL E, ATAMER M, HAYALOGLU A. Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* La-5 in white-brined cheese by microencapsulation. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 1, p. 22-29, 2009.

OZOGUL, F.; HAMED, I. Lactic acid bacteria: *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus acidophilus*. **Reference Module in Food Science**, 2016.

PARODI, P. W. A ação cooperativa de componentes bioativos na gordura do leite com PPARs pode explicar suas propriedades antidiabéticas. **Hipóteses Médicas**, v.89, n. 2, p. 1 – 7, 2016.

PASIN, B. L.; AZON C. G; GARRIGA, A. M. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. **Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v. 3, n. 1, p. 130-151, 2012.

PASQUALIM, P., CULPI, T.A.; KAMINSKI, G. A. T.; FIN, M. T.; SASSO, D. G. B., COSTA, C. K., MIGUEL, M. D., FUJIWARA, G. M., RODRIGUES, B. H., ZANIN, S. M. W. Microcapsules of calcium alginate and vegetable oil by ionic gelation: a study of encapsulation capacity and skin application. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 11, n. 1, 2010.

PATIL, J. S.; KAMALAPUR, M. V.; MARAPUR, S. C.; KADAM, D. V. Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, n. 1, p. 241- 248, 2010.

PIMPIN, L.; WU, J. H. Y.; HASKELBERG, H.; DEL GOBBO, L.; MOZAFFARIAN, D. Is Butter Back? A Systematic Review and Meta-Analysis of Butter Consumption and Risk of Cardiovascular Disease, Diabetes, and Total Mortality. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, 2016.

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

RATHORE, S., MAHENDRAKUMAR, P., CELINE, D., et al. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 2, p. 369-381, 2013.

REIS, S.M. et al. Leite fermentado prebiótico: aspectos tecnológicos, benefícios para a saúde humana e suas perspectivas. **Informe Agropecuário**, v.32, n.262, p.52-57, 2011.

RICHARDS, N. S. P. S. et al. Probiotic viability of Minas Fresh cheeses with reduced lactose content. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, p. 27-35, 2013.

RICHARDS, N. S. P. S. Novos produtos para a indústria de laticínios. In: MARTINS P.C. et al. **Sustentabilidade ambiental, social e econômica da cadeia produtiva do leite**. Brasília: EMBRAPA, p. 329-338, 2015.

RICHARDS, N. S. P.S; GIOIELLI. L. A. **Desenvolvimento e caracterização de manteigas aromatizadas**. 1. ed. Saarbrucken, Alemanha: VDM Publishing, 2016, v.1, 240 p.

RODRÍGUEZ-ALCALÁ, L. M.; CASTRO-GÓMEZ, M. P.; PIMENTEL, L. L.;

FONTECHA, J. Milk fat components with potential anticancer activity - a review, **Bioscience Reports**, v. 37, n. 2, 2017.

ROMERO, G. C. A.; MALO, A. L.; PALOU, E. Propriedades del alginato y aplicaciones en alimentos. **Temas selectos de Ingeniería de Alimentos**, v. 7, n. 1, p. 87-96, 2013.

SAAD, S. M. I. Probiótico e prebiótico: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v. 42, p. 1-15, 2006.

SANTOS, F. L. et al. Efeito da Suplementação de Lípidios na Ração Sobre a Produção de Ácido Linoléico Conjugado (CLA) e a Composição da Gordura do Leite de Vacas. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 30. n. 6. p.1931-1938, 2001.

SANTOS, J. P. V.; GOULART, S. M.; RAMOS, A. M. Influência da adição de inulina nas características físico-químicas e sensoriais do doce de leite cremoso. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v. 67, n. 388, p. 35-40, Set./Out., 2012.

SANTOS, M. K. **Encapsulação de proteína em cápsulas de alginato, alginato-quitosana e estudos de estabilidade e liberação controlada em função do Ph**. 2014. Monografia (Bacharel em Química) Centro de Ciências Naturais e Humanas – Universidade Federal do ABC, Santo André, 2014. 23 p.

SANTOS, L. C. **Análise da Qualidade Microbiológica e Físico-Química do Leite Pasteurizado Tipo C Padronizado, Envasado e Comercializado na Cidade de Pará de Minas-MG e sua Influência na Saúde do Consumidor**. Pará de Minas: Conut, 2008.

SANTOS, R. C. S **Microencapsulação de *Lactobacillus casei* por Spray Drying**. 2013.104 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SCHMIDT, B. L. U. **Efeito da suplementação com óleo de canola sobre a qualidade da manteiga e Muçarela**. 2016. 82f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia e Engenharia de Alimentos). Universidade de São Paulo.

SHAH N.P.; RAVULA R.R. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. **The Australian journal of dairy technology**, v. 55, n. 3, p. 139 – 144, 2000.

SHORI, A. B. Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit. **Journal of Biosciences**, v.24, n.1, p. 1-5, 2017.

SILVA, N. **Consumo moderado de manteiga ou margarina não afeta o coração.** Disponível em: <http://www.usp.br/agen/?p=17861>. Acesso em 20/02/2010.

SIMEONI, C. P. **Elaboração de doce de leite *light* contendo probióticos microencapsulados.** 2015, 125f. Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food: Product development, marketing and consumer acceptance: A review. **Appetite**, v. 51, n. 3, p. 456-467, 2008.

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.

SOUZA JUNIOR, W. C. **Imobilização de células permeabilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 em alginato de cálcio e sua aplicação na hidrólise de galactoligossacarídeos.** 2006. Dissertação (Mestrado) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006. 67p.

SOUZA, A. M.; SOUZA, B. S. N.; BEZERRA, I. N.; SICHIERI, R. The impact of the reduction of sodium content in processed foods in salt intake in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 2, fev, 2016.

STANTON, C.; MCMAHON, D.; MILLS, S. Dairy components, products and human health. In: MUEHLHOFF, E.; BENNETT, A.; MCMAHON, D. **Milk and dairy products in human nutrition.** Rome: FAO, p.207-242, 2013.

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

TZOMPA-SOSA, D. A.; AKEN, G. A.; HOOIJDONK, A. C. M.; VALENBERG, H. J. F. Influence of C16:0 and long-chain saturated fatty acids on normal variation of bovine milk fat triacylglycerol structure. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 4542-4551, 2014.

UFSM. Universidade Federal de Santa Maria. Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa. Manual de dissertações e teses da UFSM: estrutura e apresentação. Sistema de Bibliotecas da UFSM, Editora da UFSM. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2015, 88 p.

URBANSKA, A. M.; BHATHENA, J.; PRAKASH, S. Live encapsulated *Lactobacillus acidophilus* cells in yogurt for therapeutic oral delivery: Preparation and in vitro analysis of alginate-chitosan microcapsules. **Can J Physiol Pharmacol.**, v. 85, n. 9, p. 884-893, 2007.

VINDEROLA, G. et al. Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 2, art. 70, 2011.

WILBEY, R. A. **Butter**. In: TAMIME, A. Y. Dairy fats and related products. Chichester, U.K.: Blackwell Publishing Ltd, 2009.

YABUR, B. Y.; HERNANDEZ, C. G. Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, n. 1, p. 43-53, 2007.

YING, D. Y.; SUN, J.; SANGUANSRI, L.; WEERAKKODY, R.; AUGUSTIN, M. A. Enhanced survival of spray-dried microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in the presence of glucose. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 597-602, 2012.

YONEKURA, L., SUN, H., SOUKOULIS, C., FISK, I. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after *in vitro* digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 205-214, 2014.

ZHAO, M. et al. Ambient storage of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* ST-III by complex coacervation of type-A gelatin and gum Arabic. **Food & Function.**, v. 9, p. 1000-08, 2018.

ZUIDAM, N. J.; SHIMONI, E. **Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing.** Springer, New York, U. S. A., 2010.