

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS

CURSO ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LIA INÊS MACHADO VASCONCELOS

**MICROENCAPSULAÇÃO DE *Lactobacillus plantarum* BG 112 COM
ACRYCOAT® S100 PARA APLICAÇÃO COMO PROBIÓTICO EM
SALAME**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

MEDIANEIRA

2016

LIA INÊS MACHADO VASCONCELOS

**MICROENCAPSULAÇÃO DE *Lactobacillus plantarum* BG 112 COM
ACRYCOAT® S100 PARA APLICAÇÃO COMO PROBIÓTICO EM
SALAME**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Engenharia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus Medianeira, como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Marinês Paula Corso

Co-orientadora (UTFPR): Profa. Dra. Cristiane Canan

Co-orientadora (IPB): Profa. Dra. Teresa Dias

MEDIANEIRA

2016



Lia Inês Machado Vasconcelos

**MICROENCAPSULAÇÃO DE *Lactobacillus plantarum* BG 112 COM
ACRYCOAT® S100 PARA APLICAÇÃO COMO PROBIÓTICO EM SALAME**

Trabalho de Conclusão de Curso II como requisito parcial para a obtenção do grau de Engenheiro de Alimentos, na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus Medianeira, avaliado pela banca formada pelos professores:

Profa. Dra. Marinês Paula Corso
Orientador (a)

Profa. Dra Teresa Dias
Co-orientadora

Profa. Dra. Deisy Alessandra Drunkler
Membro da Banca

Prof Dr. Ilton Baraldi
Membro da Banca

Lia Ines Machado Vasconcelos
Aluno

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”

Medianeira, 08 de setembro de 2016.

À memória do meu avô, Henrique Vasconcelos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora de Fátima, presentes em todos os momentos dando-me força e perseverança para enfrentar os obstáculos.

À minha família, em especial aos meus pais, João Vasconcelos e Filomena Machado, pelo sacrifício em me dar uma vida digna, pelo incentivo em seguir os meus sonhos e pelo apoio incondicional.

À minha irmã Matilde Vasconcelos, pela racionalidade, compreensão e carinho.

À minha irmã Rute Vasconcelos, minha metade perfeita, meu espelho, meu exemplo, meu conforto emocional, obrigado por toda a paciência.

À minha orientadora Profa Dra Marinês Corso pela oportunidade, confiança, orientação e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho.

À minha co-orientadora Profa Dra Cristiane Canan pelo carinho, acessibilidade e indicações.

À minha co-orientadora Profa Dra Teresa Dias pela orientação e representação no Instituto Politécnico em Portugal.

À banca examinadora pela disponibilidade de avaliação e contribuição neste trabalho.

Aos professores Aziza Kamal e Ilton Baraldi pessoas de conhecimento e humildade admiráveis, pelo caloroso acolhimento, disponibilidade em ensinar e ajudar a nível pessoal e académico.

A todo o grupo laboratorial, ao Fernando e em especial Daneysa Kalschne e Rosana Buzanello pela orientação no laboratório, amizade e motivação. Vou sentir saudades da nossa equipa.

Ao meu amigo Hugo que esteve comigo durante a graduação, pela amizade, apoio moral nos momentos desanimadores e dar uma cor aos dias menos bons.

À Universidade Federal Tecnológica do Paraná, pela contribuição em minha capacitação e formação.

Ao Instituto Politécnico de Bragança pela concessão de bolsa de estudos, e seleção para mobilidade internacional.

À Sacco[®] Company, pela doação da estirpe comercial de *Lactobacillus plantarum* BG112.

À Almapal S.A, São Paulo, pela doação do copolímero do ácido metacrílico tipo B (Acrycoat[®] S100).

À Frimesa pela permissão da maturação dos salames nas suas câmaras industriais.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Lembremo-nos de que o homem interior se renova sempre. A luta enriquece-o de experiência, a dor aprimora-lhe as emoções e o sacrifício tempera-lhe o caráter”. (Chico Xavier).

“A sabedoria não nos é dada. É preciso descobri-la por nós mesmos, depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer por nós”. (Marcel Proust).

RESUMO

VASCONCELOS, Lia Inês Machado. **Microencapsulação de *Lactobacillus plantarum* BG 112 com Acrycoat® S100 para aplicação como probiótico em salame**. 2016. 125 f. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação – Curso Superior de Engenharia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Medianeira, 2016.

O *L. plantarum* tem destacado-se como um micro-organismo promissor para o uso em matrizes alimentares com fins de promoção de saúde. Contudo pela sua instabilidade frente aos agentes externos (oxigênio, pH e temperatura), o seu emprego em alimentos é comprometido. Assim, a microencapsulação pode ser uma alternativa viável para sua aplicação. A proposta deste trabalho foi otimizar a encapsulação do *Lactobacillus plantarum* BG112 com um copolímero de ácido metacrílico (Acrycoat® S100) por atomização, realizar a caracterização das microcápsulas obtidas e aplicar o micro-organismo no produto cárneo salame tipo Milano. Para otimização, empregou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 com duas variáveis independentes, o encapsulado *L. plantarum* (% m.v⁻¹) e o agente encapsulante Acrycoat® S100 (% m.v⁻¹), tendo como variável dependente o Rendimento (RE%) e Eficiência (EE%) de encapsulação do *L. plantarum*, totalizando 11 experimentos, com quatro pontos fatoriais, quatro pontos axiais e triplicata no ponto central. As características e estabilidade das microcápsulas foram estimadas pelas análises de contagem de células viáveis da cultura bem como análises de microscopia, umidade, atividade de água, higroscopicidade, Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Termogravimetria (TGA) e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-UATR). Para o DCCR, o valor máximo obtido de RE% foi de 39,3% e para EE% o valor máximo foi de 86,8%, valores esses próximos da região do ponto central sendo que ambas as respostas foram influenciadas significativamente ($p < 0,05$) pelas variáveis em estudo. Considerou-se a resposta Eficiência como o parâmetro principal para o efeito probiótico no produto proposto, definindo-se assim o ponto ótimo da superfície. Aplicou-se o *L. plantarum* microencapsulado no salame tipo Milano comparando-o a um controle com cultura *starter* comercial. A curva do pH e a perda de peso durante maturação, qualidades físico-químicas e microbiológicas foram avaliadas. Ambos revelaram ausência de *Salmonella* spp. e níveis baixos na contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, de Coliformes a 45 °C e *Clostridium* sulfito redutor a 46 °C estando aptos para consumo. Em relação às bactérias ácido-láticas totais, a contagem destas apresentou-se de acordo com a legislação vigente para caracterizar o produto final como funcional (10^8 UFC.g⁻¹). Na sequência as amostras foram avaliadas por 141 consumidores usando o teste de escala hedônica, não apresentando diferença significativa ($p > 0,05$) para os atributos avaliados (cor, aroma, textura, sabor, aceitação global e intenção de compra). Portanto, os dados demonstraram a capacidade do Acrycoat® S100 como uma opção de material de suporte para a microencapsulação de probióticos, possibilitando desenvolver uma formulação de salame tipo Milano fermentado com *L. plantarum* estável em relação ao pH, em acordo com os parâmetros físico-químicos e microbiológicos da legislação vigente, aceito sensorialmente, além de

alcançar a quantidade das bactérias ácido-láticas no nível mínimo exigido pela legislação brasileira para alimentos funcionais.

Palavras-chave: Copolímero do ácido metacrílico. Bactérias ácido-láticas. Atomização. Alimento funcional. Produto cárneo.

ABSTRACT

VASCONCELOS, Lia Inês Machado. *Lactobacillus plantarum* BG112 microencapsulated with Acrycoat® S100 for use as probiotic in salami. 2016. 125 f. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação – Curso Superior de Engenharia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Medianeira, 2016.

L. plantarum has come to stand out as a promising microorganism for use in food matrices with health promotion purposes. However, due to their instability to external agents (oxygen, pH and temperature), their use in foods is compromised. Therefore, microencapsulation is a viable alternative for your application. The purpose of this work was to optimize the encapsulation of *Lactobacillus plantarum* BG112 with a methacrylic acid copolymer (Acrycoat® S100) by spray drying, perform the characterization of the obtained microcapsules and apply the microorganisms in meat product - milano type salami. For optimization, a Central Composite Rotatable Design (CCRD) of type 2^2 with two independent variables, the encapsulated *L. plantarum* (% m.v⁻¹) and encapsulating agent Acrycoat® S100 (% m.v⁻¹) having as dependent variable Yield (%ER) and Efficiency (%EE) encapsulation of *L. plantarum*, totalizing 11 experiments with four factorial points, four axial points and triplicate at the central point. The characteristics and stability of the microcapsules were estimated by analyses: culture of viable cell count, microscopy analysis, moisture, water activity, hygroscopicity, Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermogravimetry (TGA) and Infrared Spectroscopy Fourier Transform (FTIR - UATR). In the CCRD, the maximum obtained value of %ER was 39.3% and %EE was 86.8%, values near the central point of the region where in both answers were influenced significantly ($p < 0.05$) the variables under study. It considered the response efficiency as the main parameter to the probiotic effect the proposed product, thus setting up the optimal surface. It was applied the *L. plantarum* microencapsulated in type salami Milano comparing it to a control with commercial *starter* culture. The curve of pH and weight loss during ripening, chemical-physical and microbiological qualities were evaluated. Both revealed the absence of *Salmonella* spp. and low levels in *Staphylococcus* coagulase positive count, coliforms at 45 °C and *Clostridium* sulphite reducing to 46 °C and is suitable for consumption. Regarding to total lactic acid bacteria, the concentration was against the current legislation to characterize the final product as functional (10^8 CFU.g⁻¹). Following samples were evaluated by 141 consumers by hedonic scale test, no significant difference ($p > 0.05$) showed for the evaluated attributes (color, aroma, texture, taste, overall acceptance and purchase intent). So The data demonstrated the ability of Acrycoat® S100 as a support material for the microencapsulation of probiotics, allowing develop a fermented Milano salami formulation *L. plantarum*. The proposed product was stable in relation to pH. It was in accordance with the physico-chemical parameters and microbiological of current legislation, accepted sensorially. Besides reach amount of lactic acid bacteria at the minimum level required by Brazilian law for functional foods.

keywords: Methacrylic acid copolymer. Lactic acid bacteria. Spray Drying. Functional Foods. Meat Products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tipos de estrutura obtidas pela microencapsulação: (A) micropartículas (meio) que compõem o tipo de matriz; (B) microcápsula recoberta pela conjugação de (A) e (C); (C) microcápsula final – tipo reservatório. A substância ativa é indicada pela cor cinza claro e o material de suporte cinza escuro.	28
Figura 2 – Representação esquemática do processo de secagem por atomização.	30
Figura 3 - Estrutura química básica dos derivados acrílicos e metacrílicos.	34
Figura 4 - Estrutura química de vários tipos de Eudragit®.	34
Figura 5 - Representação esquemática da estrutura química do copolímero do ácido metacrílico (Acrycoat® S100).	34
Figura 6 - Características de alguns tipos de copolímeros comerciais.	35
Figura 7 – Etapas da obtenção da cultura de <i>L. plantarum</i> BG112 liofilizada. a) <i>L. plantarum</i> pré-ativado. b) <i>L. plantarum</i> re-incubado. c) Bandejas de alumínio com caldo MRS e <i>L. plantarum</i> . d) <i>L. plantarum</i> submetido ao processo de liofilização... ..	47
Figura 8 - Encapsulação da cultura de <i>L. plantarum</i> . a) Solução <i>L. plantarum</i> em agitação magnética. b) Solução copolímero do ácido metacrílico (Acrycoat® S100) em agitação magnética. c) Solução <i>L. plantarum</i> e Acrycoat® S100 em agitação mecânica. d) Obtenção das microcápsulas por atomização em secador laboratorial Mini Spray Dryer.	49
Figura 9 – Aplicação do <i>L. plantarum</i> BG112 encapsulado na produção do salame tipo Milano. A) Carne e toucinho moídos em cutter; B) Ingredientes secos e vinho adicionados à massa cárnea; C) Salame controle amarrado e identificado; D) Salame com <i>L. plantarum</i> amarrado e identificado; E) Salames em câmaras de maturação em indústria frigorífica.	56
Figura 10 - Fatias de amostra dos salames em análise. a) Salame com <i>L. plantarum</i> BG112 encapsulado (SLPE). b) Salame controle (SC).	58
Figura 12 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para o Rendimento (RE%) e Eficiência (EE%) de encapsulação em função da razão Acrycoat S100 / <i>L. plantarum</i> (% , m.v-1).	69
Figura 13 –Imagens obtidas no MEV das microcápsulas de <i>L. plantarum</i> BG 112 encapsulado com resolução de 10 μ m. Estão ordenadas da letra A a L com os respectivos números dos ensaios correspondentes.	72

Figura 14 – Curvas de DSC correspondentes as amostras de <i>L. plantarum</i> BG112 livre e encapsulado (MC 10 e MC 5) e Acrycoat® S100.	82
Figura 15 - Curvas TGA (preto) e curvas derivadas correspondentes (azul) para as amostras de <i>L. plantarum</i> livre (a), Acrycoat® S100 (b), <i>L. plantarum</i> encapsulado MC 10 (c) e MC 5 (d).....	83
Figura 16 - Espectros de infravermelho (FTIR-UATR) das amostras de Acrycoat® S100 e das células livres e encapsuladas de <i>L. plantarum</i> correspondentes às microcápsulas dos ensaios 10 e 5.	85
Figura 17 - Espectros de infravermelho (FTIR-UATR) da amostra de <i>L. plantarum</i> encapsulado correspondentes às microcápsulas do ensaio ótimo.....	86
Figura 18 – Curva DSC (a) e TGA (preto) e curvas derivadas correspondentes (azul) (b) da amostra de <i>L. plantarum</i> encapsulado correspondente ao ensaio ótimo.....	87
Figura 19 - Curva de decréscimo do pH dos salames.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Projeção de produção de carnes no Brasil de 2014/15 a 2024/25.....	37
Tabela 2 - Tolerância de micro-organismos para salame	41
Tabela 3 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional 2 ² com as variáveis codificadas e reais e três repetições no ponto central.....	48
Tabela 4 - Formulações de salame do tipo Milano.....	54
Tabela 5 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com as variáveis do processo (codificadas e reais) com as respostas Rendimento de encapsulação (RE%) e Eficiência de encapsulação (EE%).....	64
Tabela 6 - Efeitos estimados, p-valores, coeficientes de regressão e equações dos modelos para o RE e EE de encapsulação do <i>L. plantarum</i>	66
Tabela 7 - Análise de Variância (ANOVA) dos modelos quadráticos para as respostas Rendimento e Eficiência de encapsulação.	67
Tabela 8 - Pontos ótimos para a resposta rendimento de encapsulação (RE%) e Eficiência de encapsulação (EE%).....	69
Tabela 9 - Diâmetro médio das microcápsulas de <i>L. plantarum</i> produzidas pelo processo de atomização.	74
Tabela 10 - Caracterização das microcápsulas quanto à sua umidade, actividade de água e higroscopicidade.	76
Tabela 11 - Perda de peso das amostras de salame.	89
Tabela 12 - Resultados da composição centesimal e actividade de água das amostras de Salame Controle e Salame com <i>L. plantarum</i> BG112 encapsulado.	90
Tabela 13 - Resultados das medidas instrumentais de cor e textura (força de cisalhamento) para as amostras de salame.....	91
Tabela 14 - Resultados da qualidade microbiológica dos salames.....	93
Tabela 15 - Resultados da análise sensorial dos salames.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

% _Porcentagem

ANVISA _Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BAL _Bactérias Ácido-Lácticas

CAM _Copolímero do Ácido Metacrílico e Metacrilato de Metila

DO _Densidade Ótica

DSC _Calorimetria Diferencial de Varredura

EFSA _European Food Safety Authority

FAO _Food and Agriculture Organization

FDA _Food and Drug Administration

FTIR _Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier

g _Gramas

GRAS _Generally Recognized As Safe

h _Horas

L.plantarum _*Lactobacillus plantarum*

LPE _*Lactobacillus plantarum* Encapsulado

MAPA _Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ME _Microencapsulação

MEV _Microscópio Eletrônico de Varredura

mg _Miligrama

mg.L⁻¹ _Miligrama por Litro

mL _Mililitro

MRS _Man, Rogosa & Sharpe

NaHCO₃ _Bicarbonato de sódio

OECD _Organização de Cooperação e de Desenvolvimento

°C _Graus Celsius

pH _Potencial Hidrogeniônico

PCA _Plate Count Agar

QPS _Qualified Presumption of Safety

rpm _Rotações Por Minuto

SC _Salame Controle

SLPE _Salame com *Lactobacillus plantarum* Encapsulado

TGA _Termogravimetria

UFC _Unidades Formadoras de Colónias

WHO _*World Health Organization*

SUMÁRIO

1INTRODUÇÃO	18
2OBJETIVOS	21
2.1.OBJETIVO GERAL	21
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O USO DE MICRO-ORGANISMOS EM ALIMENTOS.....	23
3.2. IMPORTÂNCIA DAS BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS	24
3.3 PROBIÓTICOS	26
3.4 MICROENCAPSULAÇÃO	28
3.4.1 Técnicas de encapsulação	29
3.4.2 Materiais encapsulantes.....	31
3.4.2.1 Polímeros acrílicos e metacrílicos	33
3.5 PRODUTOS CÁRNEOS	36
3.5.1 Salame como produto cárneo funcional	38
3.5.2 Culturas <i>Starter</i>	39
4MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 MATERIAIS	45
4.2 MÉTODOS	46
4.2.1 OBTENÇÃO DA CULTURA DE <i>L. plantarum</i> BG112 LIOFILIZADA.....	46
4.2.2 ENCAPSULAÇÃO DO <i>L. plantarum</i> BG112.....	48
4.2.3 VALIDAÇÃO DO PONTO ÓTIMO	50
4.2.4 AVALIAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS.....	50
4.2.4.1 Rendimento da encapsulação	51
4.2.4.2 Eficiência da encapsulação	51
4.2.4.3 Morfologia e diâmetro das microcápsulas	52
4.2.4.4 Propriedades físico-químicas	52
4.2.4.5 Análise do comportamento térmico	53
4.2.4.6 Análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – (FTIR-UATR).....	53
4.2.5 APLICAÇÃO DO <i>L. plantarum</i> ENCAPSULADO NA PRODUÇÃO DE SALAME TIPO MILANO.....	54
4.2.5.1 Determinação da curva de pH e perda de peso durante a maturação	57

4.2.5.2 Determinação da composição centesimal e propriedades físico-químicas	57
4.2.5.3 Determinações microbiológicas.....	58
4.2.6 ANÁLISE SENSORIAL.....	59
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1 OBTENÇÃO DA CULTURA DE <i>L. plantarum</i> BG112 LIOFILIZADA	62
5.2 AVALIAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS.....	63
5.2.1 Rendimento e Eficiência de encapsulação e Validação do ponto ótimo	63
5.2.2 Microscopia	70
5.2.3 Propriedades físicas.....	75
5.2.4 Análise de comportamento térmico	81
5.2.4.1 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Análise Termogravimétrica (TGA)	81
5.2.4.2 Análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – (FTIR-UATR).....	84
5.2.4.3 Análise para ponto ótimo.....	85
5.3 APLICAÇÃO DO <i>L. plantarum</i> BG112 ENCAPSULADO NA PRODUÇÃO DE SALAME TIPO MILANO.....	87
5.3.1 Determinação das curvas de pH e perdas de peso durante a maturação....	87
5.3.2 Determinação da composição centesimal e das propriedades físico-químicas	89
5.3.3 Determinações microbiológicas.....	92
5.3.4 Análise sensorial	94
5 CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS	100

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com alimentação e saúde reflete-se no modo de vida da população. Os hábitos alimentares alteram-se em função do que o mercado oferece e disponibiliza, favorecendo e incentivando o consumo de alimentos designados “biológicos”, “isentos de aditivos e conservantes”, com “propriedades terapêuticas” e “funcionais”, capazes de agregar benefícios à saúde dos consumidores. Nesta última classe aproximadamente 65% é representada pelos produtos probióticos no mercado mundial (AGRAWAL, 2005). Sendo que segundo a pesquisa publicada pela Transparency Market Research (2013) os mercados da América do Norte e países emergentes como o Brasil mostram grande potencial de crescimento no uso destes produtos.

Efeitos na estimulação do sistema imune, melhor absorção de determinados nutrientes e produção de vitamina B, enzimas digestivas e protetoras, fortalecimento da barreira da mucosa intestinal, redução dos episódios de diarreia, estímulo da motilidade intestinal reduzindo a constipação intestinal, alívio dos sintomas da intolerância à lactose pela melhor utilização desse dissacarídeo, prevenção ou supressão de câncer de cólon, diminuição dos níveis de colesterol e efeito anticarcinogênico foram alguns dos efeitos já relatados por indivíduos que fazem uso de probióticos (MACEDO et al., 2008; HEENAN et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2002; HOLZAPFEL et al., 1998; SALMINEN; ISOLAURI; SALMINEN, 1996).

O trato digestório representa um ecossistema de alta complexidade. A superfície da mucosa fornece uma área grande para a aderência e colonização da microbiota do intestino delgado (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002). Nas relações de mutualismo que ocorrem no intestino predominam bactérias simbiotes e comensais, que variam ao longo do comprimento do intestino, alterando-se com o desenvolvimento e a idade, influenciados também pelo meio ambiente em que vivemos. Além disso, comprova-se que estes fatores mudam a expressão do gene em células intestinais (HOOPER; GORDON, 2001).

Os benefícios proporcionados ainda necessitam de mais estudos aprofundados para sustentar a eficiente absorção de nutrientes uma vez que, o organismo por vezes potencializa respostas imunes prejudiciais para proteínas dietéticas e comensais. Defesas inatas, tais como a produção epitelial de mucinas

(células caliciformes intestinais), evitam que as bactérias ultrapassem a barreira mucosa. Bactérias não patogênicas podem influenciar diretamente o epitélio intestinal para limitar a ativação imune (NEU, 2012). Ainda assim, a motilidade no trato intestinal consagra a possibilidade para os probióticos utilizados exercerem influência sobre a microbiota intestinal (HUSEBYE et al., 2001).

Nesse contexto, devem apresentar capacidade de ativação, rápido crescimento e permanência no intestino por um período significativo, resistência aos antibióticos que possam estar presentes no alimento, porém apresentando sensibilidade àqueles utilizados em tratamentos contra bactérias lácticas (penicilina e aminoglicosídeos) e ausência de propriedades patogênicas, tóxicas e alergênicas (HUGAS; MONFORT, 1997). Adicionalmente, devem sobreviver à passagem pelo sistema digestivo podendo multiplicar-se facilmente quando atingirem o intestino. Para tanto, devem ser resistentes às condições extremas do sistema digestório, como pH, enzimas gástricas e sais biliares (COOK, 2012).

Dentre as diferentes técnicas desenvolvidas para manter a viabilidade das células, a microencapsulação (ME) é a mais promissora, evidenciada por inúmeros e recentes trabalhos divulgados (OZYURT; OTLES, 2014; ANEKELA et al., 2013; PISPAN; HEWITT; STAPLEY, 2013; SILVA et al., 2011; PEIGHAMBARDUST; GOLSHAN; HESARI, 2011; RIZQIATI et al., 2008; SIMPSON et al., 2005; PICOT; LACROIX, 2003; GARDINER et al., 2000).

A ME possibilita a manutenção de micro-organismos probióticos viáveis, tanto durante o processo de fabricação de alimentos quanto no produto final. O processo de encapsulação permite que o material de revestimento, capaz de resistir às condições extrínsecas adversas aos micro-organismos, proteja a cultura. Por outro lado, o revestimento deve ser liberado quando o micro-organismo atingir o intestino, local onde os probióticos deverão estar viáveis para desempenhar suas funções (ARSLAN et al., 2015; MARTIN et al., 2015).

Os polímeros produzidos a partir da copolimerização de ácido metacrílico e metacrilato de metila têm sido aplicados na proteção de fármacos por ME, devido à sua gastro-resistência decorrente da sua insolubilidade em pH neutro e ácido. Assim, compostos como a água e ácidos não são capazes de solubilizá-lo, permitindo que chegue intacto ao intestino, onde então será solubilizado em pH alcalino libertando o material encapsulado (COLOMÉ et al., 2007).

Considerando que o setor de produtos cárneos tem progredido anualmente e a crescente demanda por alimentos funcionais, esforços têm sido empenhados na produção de produtos cárneos funcionais, sendo os produtos fermentados, em termos de aplicação de probióticos, uma excelente alternativa (KHAN et al., 2011) pois é consumido sem prévio aquecimento, processo térmico esse que causaria a morte dos micro-organismos (MACEDO et al., 2008). Em contraste, a viabilidade bacteriana pode ser reduzida em embutidos fermentados, devido às suas características de baixo pH, atividade de água (aW) e presença de sais de cura e de outros micro-organismos competidores, os quais poderiam representar um ambiente desafiador para a sobrevivência de probióticos durante seu processo de fabricação (DE VUYST; FALONY; LEROY, 2008; LEROY; VERLUYTEN; DE VUYST, 2006). Também, as propriedades físico-químicas no salame durante o processamento são interdependentes, ou seja, qualquer alteração induzida para melhoria da sua qualidade terá influência nas características do produto final, entre elas, atividade de água, cor e textura (GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000).

Portanto, considerando que o salame é um produto de pH ácido (MACEDO et al., 2008), a aplicação de probióticos microencapsulados com copolímero de ácido metacrílico e metacrilato de metila, pode ser uma alternativa para manter a ação probiótica, sem alterar as propriedades sensoriais do produto.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Promover a encapsulação do *Lactobacillus plantarum* e aplicar em uma formulação de salame tipo Milano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Otimizar o processo de microencapsulação por *spray drying* (atomização) do micro-organismo *Lactobacillus plantarum* pelo estudo da influência da proporção de material encapsulante copolímero do ácido metacrílico (Acrycoat® S100) e de *L. plantarum* sobre o Rendimento e Eficiência da encapsulação empregando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

Determinar as características físico-químicas das microcápsulas por morfologia e diâmetro médio empregando MEV, propriedades físicas de umidade, atividade de água e higroscopicidade, análise do comportamento térmico por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), análise Termogravimétrica (TGA) e análise do espectro por Espectroscopia no Infravermelho (FTIR-UATR).

Aplicar o *L. plantarum* encapsulado no salame tipo Milano e comparar com uma amostra controle quanto ao declínio do pH e a perda de peso durante a maturação.

Caracterizar os salames pela determinação da umidade, atividade de água, pH, lipídio, proteína, cinza, parâmetros de cor e textura.

Determinar a qualidade microbiológica dos salames pela pesquisa de *Salmonella spp.*, contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, contagem de Coliformes a 45 °C, *Clostridium* Sulfito Redutor a 46 °C, de bactérias lácticas totais e bactérias aeróbicas mesofílicas.

Avaliar a qualidade sensorial dos salames por testes de aceitação global, intenção de compra e de preferência.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O USO DE MICRO-ORGANISMOS EM ALIMENTOS

As indústrias alimentares cada vez mais possibilitam a disponibilidade de alimentos que proporcionem um valor extra agregado ao seu desempenho. Tais alimentos são resultado da evolução crescente nas inovações tecnológicas e científicas responsáveis pelas alterações rápidas e contínuas na cultura alimentar, como é o caso dos probióticos. Essas alterações nos padrões de comportamento da população despertam o interesse das indústrias alimentícias como uma oportunidade de negócio (FERREIRA; AYDOS, 2010; PALANCA et al., 2006). Contudo, a percepção do consumidor será sempre um fator extremamente importante para introdução bem sucedida de novas tecnologias no mercado. Leisner (2005) indica que o fosso entre a indústria, os consumidores e grupos de pressão não é um problema inteiramente novo. Estes grupos incluem defensores ambientalistas na sua maioria, onde defendem que todos os produtos que não advêm da natureza na sua forma natural têm efeitos potencialmente desastrosos nas interações com a genética humana e ecossistemas naturais. Por outro lado, autores como Anal e Singh (2007) mostram nos seus trabalhos que as consequências do desenvolvimento e da utilização de bactérias ácido-láticas (BAL) geneticamente modificadas, por exemplo, são diferentes em comparação com outros organismos geneticamente modificados de origem vegetal ou animal. As primeiras são acompanhadas de uma forma criteriosa e cuidadosa onde potenciais efeitos intencionais e não intencionais são previstos com maior precisão.

Outra visão pode ser dada ao público de forma a atenuar essa preocupação: fortalecer os requisitos de pré-comercialização, obtenção de dados experimentais devidamente fundamentados e comprovados e estabelecer uma vigilância pós-lançamento a fim de confirmar a segurança e estabilidade dos mesmos.

Baseado nessas considerações, e devido á importância para a área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, os micro-organismos probióticos são uma opção

na agregação de valor quando aplicados a produtos alimentícios, caracterizando-se por contribuir positivamente em alguns aspectos de saúde. É fundamental a sua menção na rotulagem quando adicionados a qualquer alimento. Esta deve enfatizar os benefícios, visto que aumenta a confiança entre os consumidores.

Este trabalho num futuro próximo permitirá olhar os novos alimentos não como uma “tendência de moda” alimentar, mas sim como uma certeza de garantia de saúde. Educar e conscientizar o público sobre estas questões pode ajudar a superar as ideias/conceitos/teorias negativas relacionadas com o uso de determinados micro-organismos.

3.2 IMPORTÂNCIA DAS BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS

As BAL têm uma longa história de uso pelo homem para a produção e conservação de alimentos uma vez que compreendem um grupo amplo de micro-organismos. Incluem um grande número de bactérias Gram positivas, cocos ou bacilos, ácido-tolerantes, anaeróbios facultativos, não esporulados, catalase negativos ou positivos, sem mobilidade, tendo o ácido láctico como principal produto de fermentação (MOZZI; RAYA; VIGNOLO, 2010; SAVIJOKI; INGMER; VARMANEN, 2006; HOLZAPFEL et al., 2001). Fazem parte de uma família designada *Lactobacillaceae* classificando-se em diferentes gêneros: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* (PIARD et al., 2013). Todos são de grande interesse biotecnológico pelas suas características morfológicas, metabólicas e fisiológicas, embora o maior foco recaia sobre o gênero denominado *Lactobacillus*, o qual pode ser classificado de homofermentativo e heterofermentativo como consequência da fermentação no produto final (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

Aspectos fundamentais como a quantidade do ácido láctico reduzido, o tipo de fermentação da glicose, o seu crescimento em diferentes temperaturas do meio e a capacidade de tolerância a substâncias ácidas e alcalinas influenciam a seleção destas (STANIER et al., 1995). Segundo Sybesma, Hugenholtz e De Vos (2006) a sua heterogeneidade é fundamental para melhorar a segurança, a vida útil, o valor

nutricional, sabor e qualidade do produto. De Martins et al. (2002) e Rosa et al. (2002) apoiam estas melhorias comprovando nos seus estudos que pela produção de bacteriocinas por parte das BAL, nomeadamente por representantes dos gêneros *Lactococcus* spp, *Lactobacillus* spp e *Pediococcus* spp, quando associadas a alimentos, inibem a multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas indesejáveis. De igual forma, Fuller (1989) e Laesson et al. (2007), referem-nas como vetores vivos para a produção e entrega de proteínas de interesse tecnológico, além da produção e conservação dos produtos fermentados.

De acordo com sua temperatura de crescimento as BAL classificam-se em mesofílicas, se crescerem em torno de 30 °C e termofílicas se se desenvolverem próximas de 42 °C (SYBESMA; HUGENHOLTZ; DE VOS, 2006). Contudo, o gênero *Lactobacillus* torna-se mais seletivo no que refere ao seu crescimento em função da temperatura do meio. Há grupos que podem crescer a temperaturas de 45 °C ou mais, porém não crescem a 15 °C, sendo designados de termobactérias. Enquanto outros crescem otimamente a 15 °C, como por exemplo, as betabactérias e estreptobactérias (CARR; CHILL; MAIDA, 2002). Desta forma torna-se crucial o seu uso para melhorar produtos que requerem esta influência nas suas propriedades a fim de aumentar a sua qualidade.

Dentre as várias cepas do gênero *Lactobacillus*, o *L. plantarum* destaca-se consideravelmente. Exemplo disso são países da União Europeia como Alemanha, França, Itália, entre outros, e Estados Unidos, onde os estudos clínicos enfatizam a recorrência do seu uso pelas características desejáveis e seguras em uma variedade de alimentos: carne, peixe e produtos lácteos fermentados (SIEZEN et al., 2010; DE VRIES et al., 2006). No entanto, a ANVISA ainda não o reconhece como um probiótico, podendo citar-se junto com as espécies de BAL já requeridas: *Lactobacillus casei*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. sakei* e *L. plantarum*, entre outros, em aplicações terapêuticas no tratamento e prevenção de vários distúrbios (EFSA, 2007; OUWEHAND; SALMINEN; ISOLAURI, 2002; COLLINS; THORNTON; SULLIVAN, 1998). Ainda assim, por estar confirmada a sua falta de patogenicidade e se encontrar como um habitante natural do trato digestório (SIEZEN et al., 2012; DE VRIES et al., 2006; KLEEREBEZEM et al., 2003) o *L. plantarum* e as acima referidas BAL são incluídas em matrizes alimentares originando Alimentos Geralmente Reconhecidos como Seguros (GRAS).

Este grau alimentício vai de encontro a uma área de pesquisa na qual as alterações genéticas realizadas em laboratório podem conduzir a estirpes com características melhoradas. Na grande maioria destas alterações ocorrem mutagêneses aleatórias que podem ser atraentes para a indústria alimentar proporcionando benefícios para o consumidor (SYBESMA; HUGENHOLTZ; DEVOS, 2006), como referido anteriormente.

3.3 PROBIÓTICOS

Os probióticos têm sido definidos de variadas formas, dependendo dos efeitos dos seus mecanismos de ação sobre a saúde e o bem estar dos seres humanos. A definição comumente utilizada ainda é a de Fuller (1989): probióticos são suplementos vivos alimentares microbianos que afetam o hospedeiro beneficemente, melhorando o equilíbrio da sua microbiota intestinal. Recentemente a “Food and Agriculture Organization” (FAO) da Organização Mundial das Nações Unidas (OMS) definiu probióticos como “micro-organismos vivos (bactérias ou leveduras), que quando ingeridos ou aplicados localmente em número suficiente podem conferir um ou mais benefícios de saúde para o hospedeiro” (FAO/WHO, 2001). Os efeitos benéficos dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana incluem efeitos antagonistas e efeitos imunológicos (ANAL; SINGH, 2007). Os probióticos podem provocar respostas imunes mediadas por células, incluindo a ativação do sistema retículo-endotelial, aumento de vias citocinas e estimulação das vias pró-inflamatórias, tais como fatores de necrose tumoral e regulação de interleucina, sem ser um alvo do sistema imunológico (GILL et al., 2001; ISOLAURI et al., 2000).

Inúmeras evidências que apoiam potenciais aplicações clínicas de probióticos na prevenção e tratamento de doenças são relatadas por vários autores. Kim e Gilliland (1983); Gilliland (1990) mostram a valorização do sistema imunológico e redução da intolerância à lactose; Gilliland (1990); Ouwehand et al. (1999); Rasic (2003) atividade anti-cancerígena; Lourens-Hattingh e Viljoen (2001) uma melhor utilização dos nutrientes e incremento no valor dos alimentos; Gardiner et al. (2002) defendem o tratamento ao nível gastrointestinal, respiratório e

urogenital por meio da atuação destes na manutenção de um bom equilíbrio e composição da flora intestinal; e Rasic (2003) a redução do nível de colesterol no soro e pressão arterial. Ainda assim, estes trabalhos apelam para que alguns desses benefícios tenham mais apoio de estudos de forma a ficar completamente comprovada a ação do probiótico, para que os alimentos que o contenham produzam um efeito eficaz (RASIC, 2003; LOURENS-HATTINGH et al., 2001).

Desta forma um alimento é considerado funcional em relação à atividade probiótica, se provocar um efeito benéfico no organismo que os recebe, além da capacidade de nutrir. A eficácia desse efeito é muitas vezes dependente do aumento da absorção de minerais (NITSCHKE; UMBELINO, 2002), os efeitos inibitórios sobre a mutagenicidade (COMMANE et al., 2005) da diminuição da população de patógenos (KOTZAMPASSI; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, 2012) e das interações com as células imunocompetentes da mucosa intestinal (SAAD et al., 2013; SOLANKI et al., 2013; COOK et al., 2012; AURELI et al., 2011).

A seleção destas como probióticas incide sobre critérios como: segurança para uso humano, a estabilidade frente ao ácido e à bile e a capacidade de colonizar o trato gastrintestinal humano (OLIVEIRA et al., 2002).

O padrão para qualquer alimento vendido com alegações de saúde devido a adição de probióticos com base na porção diária requer uma concentração de 10^6 - 10^7 UFC.g⁻¹ de bactérias probióticas viáveis no produto, segundo FAO/WHO (2001). No Brasil, a Agência Nacional de vigilância Sanitária (ANVISA) refere que “a quantidade mínima viável deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC por porção diária de produto pronto para consumo, conforme indicação do fabricante”. Ainda, os micro-organismos que possuem esse apelo probiótico aceito pela ANVISA são: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei Shirota*, *L. casei variedade rhamnosus*, *L. casei variedade defensis*, *L. paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *B. longum* e *Enterococcus faecium* (ANVISA, 2008).

Existem preocupações associadas à sobrevivência das estirpes probióticas durante o processo de fabricação, armazenamento e de detecção em número elevado no produto final (LEROY; VERLUYTEN; DE VUYST, 2006). Diferentes abordagens têm sido estudadas de forma aumentar a resistência desses micro-organismos sensíveis contra condições adversas, incluindo a seleção apropriada de cepas ácido resistentes, aerotolerantes, com adaptação ao estresse, a incorporação

de micronutrientes, tais como peptídeos e aminoácidos, e resistência a tecnologias aplicada como a microencapsulação (ME) (GISMONDO et al., 1999), justificando o emprego desta técnica de proteção (SEMYONOV et al., 2010; DING; SHAH, 2009; KIM et al., 2008).

3.4 MICROENCAPSULAÇÃO

A ME consiste no isolamento de substâncias ativas (no estado líquido, sólido ou gasoso) para obter produtos com forma esférica/oval e tamanho micrométrico, em que essa substância ativa ou material de núcleo é blindado por uma membrana a partir do ambiente circundante. As estruturas que se formam podem distinguir-se em função do material externo denominado agente encapsulante e a estrutura interna de material ativo (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007; FRITZEN-FREIRE et al., 2013) observado na figura 1.

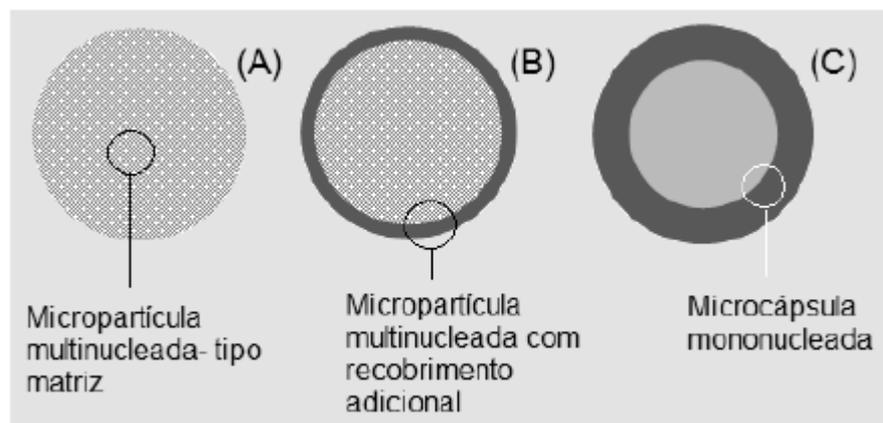


Figura 1 – Tipos de estrutura obtidas pela microencapsulação: (A) micropartículas (meio) que compõem o tipo de matriz; (B) microcápsula recoberta pela conjugação de (A) e (C); (C) microcápsula final – tipo reservatório. A substância ativa é indicada pela cor cinza claro e o material de suporte cinza escuro.

Fonte: OKURO, 2013 (apud ZUIDAM;CHIMONI, 2010, p.4).

Esta técnica permite a criação de uma barreira física entre o núcleo e as paredes materiais. Há proteção dos materiais ativos sensíveis tais como: pigmentos naturais, aromas, antioxidantes, óleos poliinsaturados, vitaminas, fármacos em geral,

drogas, alimentos como café, sopas e chás, micro-organismos, entre outros (CHEN; ZHANG; ZHONG, 2015; SINGH; DIXIT, 2014; JOYE; McCLEMENTS, 2014; FAVARO-TRINDADE et al., 2010; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010), do meio externo, em particular, umidade, pH e oxidação segundo Nesterenko et al. (2013a). A libertação do conteúdo das micropartículas em taxas controladas pode ser desencadeada por cisalhamento, por aquecimento, por pH ou pela ação enzimática (LAM ; GAMBARI, 2014).

Um único estímulo específico é o suficiente para libertar o núcleo no meio ou no momento ideal (SUAVE, 2006). Esta tecnologia tem diferentes aplicações, nomeadamente a indústria de alimentos tem relatado o implemento de formulações cada vez mais complexas com micro-organismos inseridos em carne fermentada; a adição de ácidos graxos poli-insaturados que são susceptíveis à auto-oxidação no leite, iogurtes ou sorvetes e o uso de compostos de *flavor* altamente voláteis em alimentos instantâneos, que muitas vezes só pode ser verificado por microencapsulação (GARSALLAOUI et al., 2012; KHAN et al., 2011).

A encapsulação dos probióticos em polímeros biodegradáveis tem inúmeras vantagens. Uma vez aprisionado/encapsulado em grânulos de matriz ou em microcápsulas, as células são mais fáceis de manusear do que numa suspensão ou em pasta. O número de células em esferas ou micropartículas podem ser quantificados, permitindo que a dosagem seja facilmente controlada (COOK et al., 2012).

A camada exterior pode ser utilizada para alterar as propriedades sensoriais e funcionais do produto, fornecendo um nível extra de proteção para as células. Adicionalmente, esta camada de revestimento pode ter dissolução desejável, que permite a libertação retardada das células ou lançamento mediante, por exemplo, uma alteração no pH (ANAL; SINGH, 2007). Diversos sistemas de polímeros têm sido aplicados de forma a proteger os micro-organismos na encapsulação contra a sua instabilidade. Para tal, a escolha de todos os materiais envolventes e o processo/técnica pelo qual estarão sujeitos implica um conjunto de análises.

3.4.1 Técnicas de Encapsulação

Vários processos de secagem podem ser utilizados nomeadamente a atomização, liofilização, leito fluidizado, coacervação simples e complexa, a gelificação, emulsificação/evaporação do solvente, fluido supercrítico, polimerização interfacial (policondensação), polimerização em emulsão e extrusão de forma a retirar o solvente após um processo de encapsulamento ao produzir substâncias encapsuladas (SILVA-BUZANELLO et al., 2015; CHANG et al., 2014; NESTERENKO et al., 2013a; BURGAIN et al., 2011; UMER et al., 2011; DUBEY et al., 2009; BENITA, 2006; GOUIN, 2004) . A escolha da técnica de ME para um processo em particular dependerá de fatores como o tamanho, biocompatibilidade e biodegradabilidade de micropartículas necessárias, propriedades de núcleo e de revestimento, aplicação das micropartículas, o mecanismo proposto para libertação do núcleo ativo e os custos do processo (DUBEY et al., 2009).

Para se obter células puras viáveis e aplicáveis de forma eficaz, considerando os altos custos implicados na formação destas concentrações de micro-organismos, o *spray drying* (secagem por pulverização ou atomização) (figura 2), é uma tecnologia alternativa. Pode ter como vantagem a sua facilidade de operação e custo-benefício (MURUGESAN; ORSAT, 2012). Além disso, a secagem por atomização já se encontra disponível para aplicações industriais em comparação com algumas outras técnicas de ME (BURGAIN et al., 2011).

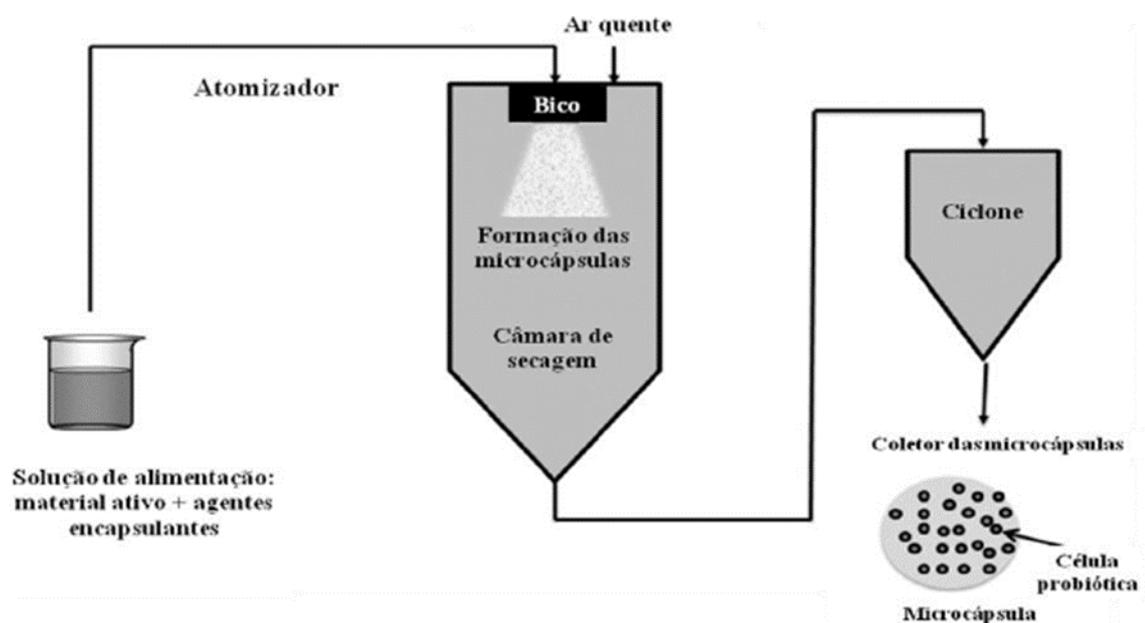


Figura 2 – Representação esquemática do processo de secagem por atomização.
Fonte: Adaptado de Burgain et al. (2011, p.472).

O processo de atomização consiste na formação de inúmeras gotículas por aspersão de uma solução, emulsão ou suspensão no interior da câmara de secagem, onde as mesmas entram em contato com o gás quente (ar ou azoto) para a subsequente desidratação, transformando o componente líquido em componentes sólidos na forma de pó posteriormente recuperados no ciclone (BURGAIN et al., 2011; GHARSALLAOUI et al., 2007). Contudo, uma das desvantagens de secagem por atomização é o risco de morte celular associada ao uso de altas temperaturas, que nem sempre são compatíveis com a sobrevivência de todas as estirpes bacterianas (BURGAIN et al., 2011).

Entretanto, trabalhos mencionam a aplicação desta técnica para promoção da encapsulação de micro-organismos com gamas de temperaturas entre 70 °C até 130 °C na câmara de secagem (ANEKELLA; ORSAT, 2013), uma vez que o tempo de contato entre estes e a fonte de calor é muito pequeno, não causando danos consideráveis no produto obtido (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Salienta-se que a estabilidade das características quanto ao armazenamento facilita a manutenção na ótica das indústrias (ANAL; SINGH, 2007).

3.4.2 Materiais Encapsulantes

A escolha correta do material de parede é muito importante, pois afeta particularmente a estabilidade das micropartículas, a eficiência do processo e o grau de proteção do núcleo ativo. O material de parede ideal deverá apresentar as seguintes características: não reativo com o núcleo; capacidade de selar e manter o núcleo no interior da cápsula; capacidade de proporcionar a máxima proteção para o núcleo perante condições adversas; ausência de sabor desagradável no caso de alimentos e aplicabilidade econômica (NAZZARO et al., 2012; GHARSALLAOUI et al., 2007).

Materiais vulgarmente utilizados como transportadores em composição de ingredientes encapsulados são polímeros sintéticos, copolímeros e biomateriais como carboidratos, gorduras, ceras e proteínas derivadas de plantas ou animais (DUBEY et al., 2009). De acordo com Fávaro-Trindade et al. (2008), a maioria dos

materiais de parede não possuem todas as propriedades desejadas. Uma prática comum envolve mistura de dois ou mais materiais.

Os polímeros derivados do petróleo habitualmente utilizados em farmácia e medicina como uma matriz para preparação de micropartículas, são poliestirenos, poliamidas, poliuretanos, poliacrilatos, polímeros fenólicos, e poli (etileno-glicóis) (DUBEY et al., 2009). Polissacarídeos estudados como uma matriz para ME são preparados de polímeros naturais como a goma arábica, ágar, caseína, gelatina, parafina e amidos (JEON et al., 2003).

As principais vantagens dos polissacarídeos focam-se na sua boa solubilidade em água e baixa viscosidade em concentrações elevadas, em comparação com polímeros acrílicos. Frequentemente carboidratos são misturados com proteínas com intuito de melhorar as propriedades emulsionantes e filmogênicas durante a sua encapsulação (MENDANHA et al., 2009; PEREIRA et al., 2009; PIERUCCI et al., 2007).

Alguns estudos estão direcionados na identificação de suportes estruturais apropriados para encapsulação de bactérias probióticas. Empregam constituintes de proteínas extraídas a partir de produtos derivados de animais (soro, gelatina, caseína) e de vegetais (soja, ervilha, cereais) (MITROPOULOU et al., 2013; BOSNEA et al., 2009; SANDHOLM MATTILA et al., 2002), permitindo que sistemas com diferentes atributos funcionais possam ser criados (JOYE; McCLEMENTS, 2014). Seja de carácter hidrofílico ou hidrofóbico, a escolha do suporte terá diretamente influência na liberação do princípio encapsulado.

De acordo com Gouin (2004), uma boa encapsulação deve permitir que o núcleo seja isolado do ambiente externo até o lançamento no lugar desejado. Entretanto, ressalta-se que na encapsulação de probióticos o material encapsulante deve promover a liberação dos micro-organismos no intestino, e tratando-se de polímeros naturais, a liberação pode ocorrer antes do ideal devido à solubilidade desses materiais em água. Deste modo, a libertação no momento certo e lugar adequado são aspectos extremamente importantes para atingir a eficiência, reduzir a dose necessária de aditivos e expandir as aplicações de compostos de interesse (DA SILVA et al., 2014).

3.4.2.1 Polímeros acrílicos e metacrílicos

Com vista à utilização de uma partícula biopolimérica nova e funcional, têm-se recorrido ao uso de copolímeros à base de polimetacrilato (THAKRAL; THAKRAL; MAJUMDAR, 2013). Estes copolímeros são agentes formadores de filmes que podem ser obtidos pela combinação de monômeros e co-monômeros, originando derivados bem distintos. Apresentam-se na forma natural ou sintética, sendo utilizados para revestir fármacos ingeridos por via oral sólida nomeadamente comprimidos, cápsulas, grânulos e partículas nanométricas. Uma vez combinados com um fármaco ou outro agente ativo, liberam as substâncias encapsuladas de forma controlada, com o objetivo de alcançar terapias mais eficazes, eliminando a possibilidade de superdosagem (MOUSTAFINE et al., 2013). Estas características podem estar relacionadas com as diferentes propriedades químicas dos grupos funcionais ligados à cadeia carbônica principal do polímero (DITTGEN et al., 1997; KHAN; REDDY, 1997).

Os acrilatos e os metacrilatos distinguem-se pela substituição do hidrogênio do primeiro carbono, por um grupo metila, no segundo carbono. A ausência de grupos metila, que conferem características hidrofóbicas nos derivados acrílicos, resulta em sua maior reatividade e hidrofiliidade quando comparados aos derivados metacrílicos. Desta forma, todos são produtos da polimerização aniônica do ácido metacrílico e metacrilato de metila (ESPOSITO et al., 2002).

A figura 3 evidencia a estrutura química da unidade básica de polímeros acrílicos e metacrílicos (DITTGEN et al., 1997). A figura 4 mostra vários exemplos de polímeros específicos na sua estrutura química, designados comercialmente neste caso, pelo nome Eudragit[®]. A figura 5 traduz a representação esquemática da estrutura química do polímero copolímero do ácido metacrílico/Acrycoat[®] S100.

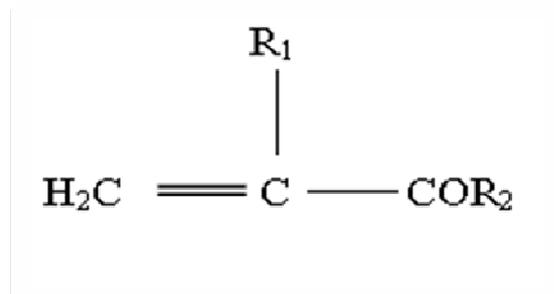
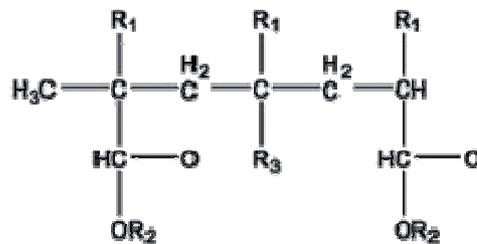


Figura 3 - Estrutura química básica dos derivados acrílicos e metacrílicos.

Fonte: Adaptado de Villanova (2001).



$\text{R}_1 = -\text{CH}_3$, $\text{R}_2 = -\text{CH}_3$ e $\text{R}_3 = -\text{COOH}$ (Eudragit L e S)

$\text{R}_1 = -\text{CH}_3$, $\text{R}_2 = -\text{CH}_2\text{CH}_3$ e $\text{R}_3 = -\text{COOH}$ (Eudragit L100-55 e L30D-55)

$\text{R}_1 = -\text{CH}_3$, $\text{R}_2 = -\text{CH}_3$ e $\text{R}_3 = -\text{COOCH}_3$ (Eudragit[®] NE30D)

$\text{R}_1 = -\text{CH}_3$, $\text{R}_2 = -\text{CH}_3$ e $\text{R}_3 = -\text{COOCH}_2^+\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$ (Eudragit[®] NE30D)

Figura 4 - Estrutura química de vários tipos de Eudragit[®].

Fonte: Freire et al. (2006, p.340).

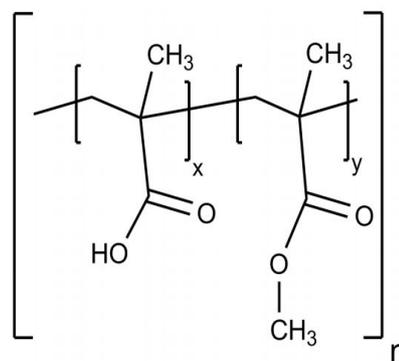


Figura 5 - Representação esquemática da estrutura química do copolímero do ácido metacrílico (Acrycoat[®] S100).

Com base nessa estrutura química, suas propriedades e no objetivo farmacotécnico a ser alcançado, os polímeros são então determinados por grupos funcionais R (ácidos ou alcalinos) que traduzem uma grande variedade de formas físicas diferentes: dispersão aquosa, solução orgânica, grânulos e pós (MOUSTAFINE et al., 2013). Além disso, são distinguidos como polímeros do tipo A, B e C conforme as suas características de solubilidade e permeabilidade. Alguns exemplos comerciais destes polímeros e suas características podem ser visualizadas no quadro abaixo (Figura 6).

Nome comercial	Tipo	Características de solubilidade e permeabilidade	Plastificante recomendado
<i>Eudragit</i> [®] E	Copolímero aminoalquilmetacrilato	Solúvel em suco gástrico até pH 5,0. Em pH >5,0 intumescem e tornam-se permeáveis	Não é necessário
<i>Eudragit</i> [®] L100	Copolímeros do ácido metacrílico Tipo A	Solúveis nos fluídos intestinais em pH > 6,0	Trietilcitrate e polietilenoglicol
<i>Eudragit</i> [®] L100-55 <i>Eudragit</i> [®] L30D	Copolímeros do ácido metacrílico Tipo C	Solúveis nos fluídos intestinais a partir de pH de 5,5	Trietilcitrate e polietilenoglicol
<i>Eudragit</i> [®] S	Copolímeros do ácido metacrílico Tipo B	Solúvel em pH a partir de 7,0	Trietilcitrate e polietilenoglicol
<i>Eudragit</i> [®] RL	Copolímero metacrilato de amônio Tipo A	Filmes de alta permeabilidade	Trietilcitrate e polietilenoglicol
<i>Eudragit</i> [®] RS	Copolímero metacrilato de amônio Tipo B	Filmes de baixa permeabilidade	Trietilcitrate e polietilenoglicol
<i>Eudragit</i> [®] NE	Dispersão polimérica	Filmes de média permeabilidade	Não é necessário

Figura 6 - Características de alguns tipos de copolímeros comerciais.

Fonte: Adaptado de Ferreira (2006, p.11).

A encapsulação de diversos fármacos com copolímeros de ácido metacrílico e metacrilato de metila já foram reportados (KUMAR; MISHRA; EASWARI, 2013; METHA et al., 2013; MOUSTAFINE et al., 2013; COLOMÉ et al., 2007; LECOMTE et al., 2005). A sua aplicação traz inúmeras vantagens como revestimento de todas as formulações orais sólidas como cápsulas, obtenção de comprimidos de liberação

sustentada controlada por matrizes, aplicação localizada para tratamento de doenças do cólon (METHA et al., 2013), melhoria da administração transdérmica, na vacinação e na aplicação em medicamentos gastrointestinais. Nesta última, as funcionalidades das partículas foram concebidas para ter um efeito de proteção dos ativos sensíveis ao líquido gástrico e proteção da mucosa gástrica contra ativos agressivos (NIKAM et al., 2011).

Lecomte et al. (2005) mostraram a importância do pH no qual as misturas de polímeros sensíveis a este são altamente adequadas para fazer variar a cinética de liberação do fármaco. Em pH baixo é controlada principalmente por difusão através de revestimentos de filme intacto em misturas de Eudragit®. Já em pH elevado, a absorção do polímero entérico dos revestimentos desempenha-se de forma mais eficiente. Em todos os casos, os perfis de liberação do fármaco observados poderiam explicar-se com base nos processos de transporte de massa que ocorre.

Moustafine et al. (2013), concluíram que os vários graus de solubilidade confirmaram que a maioria destes copolímeros apresenta sensibilidade ao pH, produzem filmes resistentes ao fluido gástrico e mascaramento de sabor e odor. Uma vez que a liberação desses compostos só ocorre em pH igual ou superior a 7,0 compostos como a água e ácidos não são capazes de solubilizá-lo, permitindo que microcápsulas revestidas cheguem intactas ao intestino, onde serão liberadas pela solubilização em pH alcalino (COLOMÉ et al., 2007). Metha et al. (2013) comprova também que a liberação do composto no meio relaciona-se com a permeabilidade da membrana da matriz, ou seja, quanto mais permeável for, menor é a sua eficácia pois liberta o material antes de atingir o sítio alvo, aumentando a sua concentração.

Por já ser utilizado na indústria farmacêutica, sem restrição de uso, uma vez que são biocompatíveis, biodegradáveis (MOUSTAFINE et al., 2013) e não tóxicos (THAKRAL; THAKRAL; MAJUMDAR, 2013), o uso do copolímero metacrilato de metila, ou éster metílico do ácido metacrílico apresenta-se como uma ótima opção no atual estudo, a fim de aumentar a viabilidade do probiótico aplicado no salame com liberação controlada.

3.5 PRODUTOS CÁRNEOS

Por fazerem parte da base alimentar da população, pelo contínuo aprimoramento das tecnologias e investimentos aplicados ao nível da genética, nutrição e bem estar animal, o consumo de produtos cárneos continua a expandir-se. Segundo os dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) a produção total de carnes no Brasil entre 2014/15 está estimada em 25,8 milhões de toneladas. A projeção para os próximos dez anos pretende atingir os 33,7 milhões de toneladas de carne (frango, bovina e suína), resultando num aumento de produção de 7,9 milhões de toneladas correspondente a 30,7% desse total (BRASIL, 2015) detalhado na Tabela 1.

Tabela 1 - Projeção de produção de carnes no Brasil de 2014/15 a 2024/25

Produto	Unidade	2014/15	Projeção		Variação % 2014/15 a 2024/25
			2015/16	2024/25	
Carne Frango	Mil t	13.133	13.730	17.689	34.7
Carne Bovina	Mil t	9.206	9.695	11.355	23.3
Carne Suína	Mil t	3.480	3.675	4.700	35.1
Total	Mil t	25.820	27.100	33.745	30.7

Acréscimo de 7,9 milhões de toneladas de carne

Fonte: Adaptado de AGE/MAPA; SGE/EMBRAPA (apud BRASIL, 2015, p.91).

As instituições Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico (OECD) e *Food and Agriculture Organization* (FAO) (2015) citadas pelo MAPA nesta avaliação prevêm que o setor de carnes, nos próximos anos, passe por intenso crescimento no Brasil. Desta forma, aliado a um crescimento populacional e à intensificação das relações comerciais internacionais, o mercado criará um alto padrão de competitividade pelo que deverá estar atento às necessidades eminentes dos consumidores.

Acredita-se que mudanças recentes no padrão alimentar, com maior consumo de refeições rápidas industrializadas que se caracterizam por igual valor nutritivo, são resultados da influência da sociedade onde o ser humano está inserido (ENES, SLATER, 2010; FERREIRA, AYDOS, 2010). A busca instintiva por melhores condições de vida e o aumento da qualidade desta motivam a procura de alimentos práticos e funcionais.

Segundo os autores Oliveira et al. (2013) a industrialização da carne parte de processos que visam melhorar a vida útil da matéria-prima, desenvolver sabores que

induzam ao seu consumo e criar novas alternativas de aproveitamento de peças ou subprodutos com dificuldade de comercialização. Na industrialização, são adicionados sais de cura (cloreto de sódio, nitrato e nitrito) na elaboração dos produtos, sendo denominados produtos cárneos curados. Dentro destes, podem distinguir-se os produtos curados de massa fina e os produtos curados de massa grossa, que por sua vez se divide em não fermentados (linguiças e chouriços) e fermentados, onde se inclui o salame (TERRA, 2003).

3.5.1 Salame Como Produto Carneio Funcional

A introdução dos produtos cárneos no Brasil como o salame data da colonização por emigrantes italianos e alemães, nomeadamente na região sul do país. Este fenómeno possivelmente deu origem ao implemento de industrialização do produto que atualmente se destaca no setor de carnes (LAPPE, 2004).

Genericamente aplicado aos embutidos fermentados, o nome salame no Brasil é atribuído aqueles cuja quantidade de sal, tipo de condimentos utilizados, forma de preparação da gordura, dimensão e natureza do envoltório utilizado e espécie de carne animal empregada, constituem os fatores básicos que os diferenciam do restante dos embutidos (BERAQUET, 2005).

O salame é o produto cárneo industrializado obtido de carne suína e/ou bovina, adicionada de toucinho, ingredientes, embutido em envoltórios naturais e/ou artificiais, curado, fermentado, maturado, defumado ou não, e dessecado. O produto será designado de Salame, seguido ou não das expressões que caracterizem sua origem ou processo de obtenção, exemplos: Salame Tipo Italiano, Salame Tipo Milano, Salame Tipo Hamburguês, Salame Tipo Friolano, Salame Tipo Calabrês, Salame Tipo Alemão, Salaminho e outros segundo a Instrução Normativa nº 22 (BRASIL, 2000).

De acordo com a legislação nacional referida, na elaboração do salame, há obrigatoriedade de conter no mínimo 60% de carne suína, além de ingredientes como toucinho, sal, nitrito e/ou nitrato de sódio e/ou potássio. A mesma refere também que ingredientes opcionais, se adicionados, poderão resultar em variações nos diferentes tipos de salame.

Agregar valor é imperativo para fazer a diferença na indústria agroalimentar de carne. Quando micro-organismos são adicionados a um alimento, objetiva-se incrementar suas propriedades, criando um novo alimento funcional que promova efeitos positivos no organismo que o recebe. No salame, o processo de fermentação microbiana viabiliza a obtenção de alguns nutrientes e atributos de aroma e sabor que conferem as características sensoriais. Esta fase é a mais longa e complexa do processo de elaboração. É influenciada pela adição combinada de carboidratos e culturas *starter* (ou iniciadoras) aos processos fermentativos com resultados positivos traduzidos no alto poder de conservação, na aceleração da desidratação (etapa final) e no sabor ácido típico.

Conforme o processo de maturação decorre, observa-se a queda do pH de aproximadamente 6,0 até 5,0, devido aos processos fermentativos homoláticos, que convertem uma molécula de glicose em duas moléculas de ácido láctico pela utilização da via Embden-Meyerhof-Parnas. Os valores do pH voltam a subir, até próximo a 5,3, devido a ocorrência postergada de proteólise e lipólise. (MASSAGUER, 2006). O pH no qual a carga líquida da proteína é zero é chamado de ponto isoelétrico. Nesse ponto ocorre a insolubilização das proteínas miofibrilares e consequente perda de água por desidratação. Logo, a influência do pH no salame é imprescindível, sendo que o pH é decorrente da cultura *starter* adicionada e das condições de cultivo empregadas (MASSAGUER, 2006).

Diferentes culturas *starter* têm sido estudadas e analisadas (SIDIRA et al., 2015; SAYAS-BARBERÁ et al., 2012; HUGHES et al., 2002) afim de obter o maior aproveitamento da sua atividade probiótica sem originar características sensoriais indesejáveis no produto final.

3.5.2 Culturas *Starter*

O objetivo de uma cultura *starter* é acelerar o processo fermentativo. O critério fundamental para a seleção de culturas iniciadoras envolve taxa de acidificação e a produção de *flavors* (LEROY; DE VUYST, 2006). Segundo Lucke (2000) a adição aos produtos cárneos pode proporcionar maior segurança e estabilidade ao produto, aumentar a sua vida útil e fornecer diferentes resultados

nas propriedades sensoriais, incrementando benefícios à saúde devido às características probióticas.

Estas devem ter capacidade de se adaptar às condições do processamento do alimento, em relação à compatibilidade com as matérias-primas (sal, nitritos, dextrose, antioxidantes, entre outros no caso do salame) e posteriormente ao meio onde irão atuar, ou seja, condições gástricas e intestinais, pois estas serão o meio mais adverso e endógeno. No mesmo sentido, deverão assegurar a qualidade microbiológica do produto pela produção de bactericidas e pela redução do pH devido à formação do ácido láctico, gerando proteólise e lipólise de forma mais intensa e um perfil volátil mais complexo (MATTEI, 2014), não desvalorizando a formulação e a tecnologia de fermentação, visto que os fatores ambientais interagem no sentido de selecionar um número limitado de estirpes mais competitivas. Nas carnes, a sua mistura é feita visando somar as suas características individuais de forma a obter-se o efeito desejado no produto final.

As linhagens de bactérias ácido lácticas geralmente consideradas como naturais em carnes e produtos cárneos mencionadas por Hugas (1998) são: *Carnobacterium piscicola*, *C. divergens*, *L. sakei*, *L. viridescens*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Le. Gelidum*, incluindo-se na categoria de culturas *starter*.

As culturas *starter*, em sua maioria bactérias lácticas, crescem em condições anaeróbias ou microaerófilas com temperaturas ótimas entre os 30 e 40 °C. Esta variável é o principal fator responsável pelas reações de deterioração. Contudo, atividade de água e a disponibilidade de oxigênio vão determinar a quantidade e o tipo de micro-organismos que poderão desenvolver-se naquelas condições em carnes e produtos cárneos (CAYRÉ et al., 2003; DEVLIEGHIERE et al., 1998 (a)). O pH é outro fator de importância. Quando se caracteriza de ácido, implica um crescimento adaptado a essas condições de cultivo (SILVA et al., 2010), nomeadamente na faixa que varia entre 5,5 a 6,0 de pH (SALMINEN; ISOLAURI; SALMINEN, 1996). Crescendo a um pH 4,5 os micro-organismos geralmente denominam-se de acidúricos (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007). Embora a rápida acidificação possa reduzir os perigos microbiológicos nos produtos fermentados, ainda assim micro-organismos patogênicos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* podem estar presentes (LEROY et al., 2006). O *S. aureus* multiplica-se e produz enterotoxina na

fase inicial de maturação da carne; a *E. coli* e a *Salmonella* têm maior importância em produtos pouco secos e pouco maturados (LUCKE, 2000; CASTAÑO et al., 2002 apud LEROY et al., 2006). A *L. monocytogenes* tem sido detectada no produto final segundo os autores Aymerich et al. (2003), possivelmente devido à sua presença na carne crua (LUCKE, 2000; SAMELIS; METAXOPOULOS, 1999). A ANVISA, pela resolução RDC nº 12 de 2 de Janeiro de 2001, aprovou o regulamento técnico de padrões microbiológicos para alimentos, onde inclui um item especificamente direcionado para produtos cárneos maturados como os salames (BRASIL, 2001). A Tabela 2 define o padrão microbiológico para os micro-organismos previstos no salame.

Tabela 2 - Tolerância de micro-organismos para salame

Micro-organismos	Tolerância (UFC.g-1)
Salmonella spp.	Ausência em 25 g
Coliformes a 45°C	10 ³
Staphylococcus coagulase positiva	5x10 ³

Fonte: Adaptado de Brasil (2001).

Sendo a carne um alimento que apresenta alta atividade de água, rico em substâncias nitrogenadas, minerais, e com um pH favorável para a maioria dos micro-organismos, impõe-se boas práticas de manipulação evitando contaminações indesejáveis do produto cárneo por micro-organismos infecciosos ou substâncias tóxicas e deterioração do mesmo. Garantidas as condições ideais, torna-se viável a aplicação das culturas funcionais nos produtos cárneos, dispondo de técnicas de imobilização que focam na estabilização das células e formulação de novos tipos de alimentos, com introdução de novas características sensoriais (LUCKE, 2000). Tais são conseguidas, pois na produção de produtos cárneos fermentados, o ácido láctico coagula as proteínas solúveis na carne, reduz a sua capacidade de retenção de água e contribui com o processo de secagem onde as condições de incubação apresentam-se a 30 °C por 48 h (KALSCHNE et al., 2015; MACEDO et al., 2001).

Visto isto, a composição nutricional cárnea pode ser alterada por adição direta de ingredientes alimentares ou pela inclusão de compostos bioativos em dietas alimentares e, mais vantajoso, no caso de probióticos não teria de ser declarado como um aditivo alimentar. Torna-se importante uma vez que os aditivos

alimentares quando adicionados podem violar o padrão de identidade destes produtos (DECKER, 2010).

Vários estudos na área de produção de salame indicam o interesse na inovação deste produto.

Degenhardt (2006) investigou a influência da presença de bactérias lácteas como o *Lactobacillus plantarum* e de Lactato de Sódio intencionalmente adicionados no processo de fabricação de salames tipo italiano na prevenção de contaminação no processo de fabricação, concluindo que aplicação destas culturas bioprotetoras seja incluída na produção do salame.

Dalla Santa (2008) analisou a qualidade de cinquenta amostras de salames artesanais e culturas *starter* na produção de salame, onde compara teores de umidade, pH, atividade de água, lipídios, cinzas, e proteínas, contagem de micro-organismos e isolamento de bactérias lácticas com a legislação brasileira. Este conclui que a fiscalização sobre a qualidade dos salames deve intensificar-se uma vez que nem todas as amostras estavam de acordo com a legislação, em especial no que se refere a parâmetros físicos e químicos, além de terem sido detetados coliformes fecais e micro-organismos como *L. monocytogenes*.

Cirolini et al. (2010) elaboraram um salame tipo Italiano utilizando *culturas starter* nativas de forma a avaliar suas características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais, onde verificou-se que a adição destas proporcionava produtos seguros e com *flavor* diferenciado quando comparado com salames elaborados com culturas *starter* comerciais.

Rubio et al. (2013) avaliaram a competitividade de duas cepas de *Lactobacillus* probióticos (*Lactobacillus plantarum* 299v e *Lactobacillus rhamnosus* GG) durante a fabricação de embutidos fermentados espanhóis e seus efeitos sobre as qualidades de higiene e qualidades sensoriais dos produtos finais. Ambas as estirpes impediram o crescimento de *Enterobacteriaceae* ao longo de todo o processo de amadurecimento. *L. rhamnosus* GG e *L. plantarum* 299v em alta concentração de inóculo (cerca de 10^7 UFC.g⁻¹) produziram uma diminuição acentuada dos valores de pH e de baixo crescimento de bactérias gram-positivas. O *L. plantarum* 299v inoculado produzindo salames funcionais com uma qualidade sensorial geral satisfatória. Além de constatarem que não houve grandes diferenças em parâmetros físico-químicos ou atributos sensoriais registrados quando

comparados com embutidos fermentados, adicionando, assim, mais valor para este tipo de produto de carne como um veículo probiótico.

Mendes et al. (2014) avaliaram a inserção de fibras provenientes de farinhas obtidas dos subprodutos do vinho tinto nas características tecnológicas de salames tipo Milano, concluindo existir vantagens nutricionais relacionadas à adição de fibras no produto.

Rubio et al. (2014) em estudo compararam três potenciais cepas de *Lactobacillus* probióticos (*Lactobacillus casei* CTC1677, *L. casei* CTC1678 e *Lactobacillus rhamnosus* CTC1679). Previamente isolaram-nas e caracterizaram-nas, e em seguida compararam com outras três cepas probióticas comerciais (*Lactobacillus plantarum* 299v, *L. rhamnosus* GG e *L. casei* Shirota). Todas foram avaliadas durante a fabricação de embutidos fermentados de baixa acidez (salaminhos típicos da Catalúnia designados como fuets) com teor reduzido de sódio e de gordura. As estirpes inoculadas foram monitorizadas com sucesso durante o processo. O resultado mostrou que o *L. rhamnosus* CTC1679 foi a cepa capaz de crescer e destacar-se das demais (níveis de 10^8 UFC.g⁻¹) a população de BAL endógenas do meio. Assim, o fuet que conteve *L. rhamnosus* CTC1679 como uma cultura de arranque pode ser um veículo alimentar apropriado para a entrega de bactérias probióticas. Todos os produtos finais, em geral, obtiveram qualidade sensorial sem qualquer perda de aroma perceptível, e propriedades sensoriais características de embutidos fermentados.

Sidira et al. (2014) fizeram avaliação da linhagem *Lactobacillus casei* ATCC 393 como efeito protetor contra deterioração das salsichas secas probióticas fermentadas na forma livre e imobilizada. Utilizaram este em grãos de trigo contra a deterioração de micróbios patogênicos aplicados nas salsichas contendo reduzida ou quantidades insignificantes de sais de cura. Os resultados mostraram que as culturas probióticas provocam aumento significativo de “auto-vida” e a resistência à deterioração foi mais proeminente em amostras contendo células imobilizadas. Embora a deterioração tenha sido promovida principalmente pelo crescimento de leveduras/bolores, uma diminuição drástica foi observada em enterobactérias, estafilococos e pseudomonas.

Sidira et al. (2015(a)) fez o estudo da utilização de culturas iniciadoras probióticas de *Lactobacillus* com interesse tecnológico no processo de embutidos fermentados, onde conseguiu selecionar pelo menos vinte estirpes deste gênero

capazes de sobreviver ao pH do estômago, além de auxiliarem nas modificações da matéria-prima no processamento de salame.

Sidira et al. (2015(b)) tiveram como objetivo do seu estudo a avaliação da sobrevivência do mesmo micro-organismo (*Lactobacillus casei* ATCC 393) imobilizado em grãos de trigo seco, a fim de gerar compostos voláteis durante a produção de salames fermentados tratados termicamente. Para efeito de comparação utilizaram salames contendo células *L. casei* livres e salames com nenhuma cultura de arranque, bem como uma de produção comercial semelhante, também foi incluída no estudo. Os resultados mostraram que a cultura de arranque afetava significativamente a produção de compostos voláteis; a amostra que conteve 30 g de células imobilizadas/kg de mistura de enchimento, apresentou maior teor de ésteres e álcoois na amostra; e observou que a concentração mais elevada de ácidos orgânicos estava nos salames com nenhuma cultura de arranque. Em contraste, o produto comercial continha a concentração mais baixa de voláteis. Desta forma a composição volátil foi afetada principalmente pela natureza da concentração da cultura fermentativa.

Sidira et al. (2015(c)) no mesmo ano adicionaram ao estudo anterior avaliação da evolução dos compostos de sabor em salsichões probióticos fermentados durante o amadurecimento. Para tal utilizaram a mesma cepa ATCC 393 imobilizada em grãos de trigo seco na geração de compostos voláteis de enchidos secos probióticos fermentados durante o seu amadurecimento. Para efeito de comparação, analisaram salsichas contendo células *L. casei* livres ou nenhuma cultura de arranque. Tanto a cultura de probiótico como o processo de amadurecimento afetaram significativamente a concentração de todos os compostos voláteis. O maior teor de voláteis totais, ésteres, álcoois e compostos variados foi observado em salsichas que continham a maior quantidade imobilizada de cultura (300 g.kg⁻¹ de mistura de enchimento) num amadurecido durante 45 dias.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

A cultura pura de *Lactobacillus plantarum* BG112 foi fornecida pela Sacco® (Campinas, São Paulo, Brasil). O material encapsulante, copolímero do ácido metacrílico (CAM) (Acrycoat® S100) tipo B foi fornecido pela Almapal S.A, São Paulo, Brasil. Todos os reagentes usados ao longo do trabalho foram de pureza analítica, bem como os meios de cultura padrão microbiológico adequados, citando-se os principais: Caldo MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) e Ágar MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) (Merck, Darmstadt, Alemanha), Ágar Contagem Padrão (PCA) (HIMEDIA Laboratories PVT Limited, Mumbai, India), Água destilada peptonada 0,1% (Bacto™ –Pepton Enzymatic Digest of Protein) (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD, USA), Água destilada peptonada tamponada (ADPT) 0,1% (Micro Med, Rio de Janeiro, Brasil), Tween 80 (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), Bicarbonato de sódio (NaHCO₃) (Alphatec Quimica fina, São Paulo, Brasil)

Para a aplicação da cultura encapsulada no produto cárneo salame tipo Milano utilizou-se como matéria-prima carnea retalho suíno magro resfriado e toucinho suíno resfriado, ambos inspecionados, e os ingredientes, sal, açúcar, pimenta branca, alho desidratado e vinho tinto seco, os quais foram obtidos em estabelecimento comercial local. Os aditivos utilizados: cura Ibrac e Ibracor 501 foram fornecidos pela Ibrac, São Paulo, Brasil.

O processo de obtenção da cultura encapsulada, a aplicação desta no produto cárneo salame tipo Milano, bem como as análises de caracterização do encapsulamento, do encapsulado e do salame tipo Milano foram todas realizadas nos laboratórios de Análises Microbiológicas, Análises Físico-químicas, PPGTA 01, 02 e 03, Análises de Alimentos, Industrialização de Carnes, Análises Sensoriais, Fenômenos de Transporte e Operações Unitárias, Análises Térmicas e Espectrometria de Combustão e Materiais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus Medianeira, com exceção da análise de microscopia eletrônica que foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica e de Microanálise – LMEM da Universidade Estadual de Londrina (Londrina, Paraná, Brasil).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 OBTENÇÃO DA CULTURA DE *L. plantarum* BG112 LIOFILIZADA

A cultura liofilizada de *L. plantarum* BG112 foi pré-ativada (0,1% m.v⁻¹) em caldo MRS e incubado em estufa bacteriológica (Orion 502, FANEM, São Paulo, Brasil) por 6 h a 30 °C (Figura 7a). Na incubação, alíquotas de 5 mL foram transferidas para erlenmeyer contendo 95 mL de caldo MRS e incubado por aproximadamente 12 h a 30 °C (até atingir a fase estacionária). Na re-incubação, alíquotas de 10 mL foram transferidas para erlenmeyers contendo 190 mL de caldo MRS (Figura 7b) e incubados por aproximadamente 12 h a 30 °C (até atingir a fase estacionária). Nas etapas de incubação e re-incubação realizaram-se as leituras da densidade ótica (DO) e enumeração do micro-organismo. Em intervalos de 1h, alíquotas de 1 mL foram colocadas em cubetas de quartzo, levadas ao espectrofotômetro (Lambda XLS, Perkin Elmer, Beaconsfield, Reino Unido) calibrado no comprimento de onda de 600 nm e realizada a leitura da absorvância (KALSCHNE et al., 2014). Com as medidas de absorvância, para a cultura analisada, foram construídas, simultaneamente, as curvas de crescimento. Em intervalos de 2 h, alíquotas de 1 mL da cultura foram retiradas para realização das diluições seriadas em ADPT (0,1%), com agitação intercalada por vortex (Is logen, Ism 56/4, Brasil), plaqueadas em profundidade com sobrecamada de ágar MRS e incubadas de forma invertida em atmosfera normal por 48 h a 30 °C (KALSCHNE et al., 2015).

Após a cultura atingir a fase estacionária na etapa de re-incubação foi congelada a -18 °C por 48 h em bandejas de alumínio com 50 mL de caldo cada (Figura 7c) cobertas com papel poroso e submetida ao processo de liofilização (Labconco, modelo FreeZone 6L, Kansas, EUA) a temperatura de aquecimento na 25 ± 1 °C e pressão de 0,050 mBar (Figura 7d).

Uma alíquota de 1 g da cultura em pó liofilizada foi dissolvida em 9 mL de ADPT (0,1%) com agitação por vortex (Is logen, Ism 56/4, Brasil). Na sequência foram realizadas as diluições seriadas, com agitação intercalada por vortex (Is logen, Ism 56/4, Brasil), e plaqueamento em ágar MRS, conforme previamente descrito. Foram selecionadas para contagem as placas com 25 a 250 colônias e a diluição

inoculada a fim de garantir contagens superior a 10^7 UFC.mL⁻¹. A cultura de *L. plantarum* BG112 liofilizada foi mantida congelada a -18 °C até final do estudo.

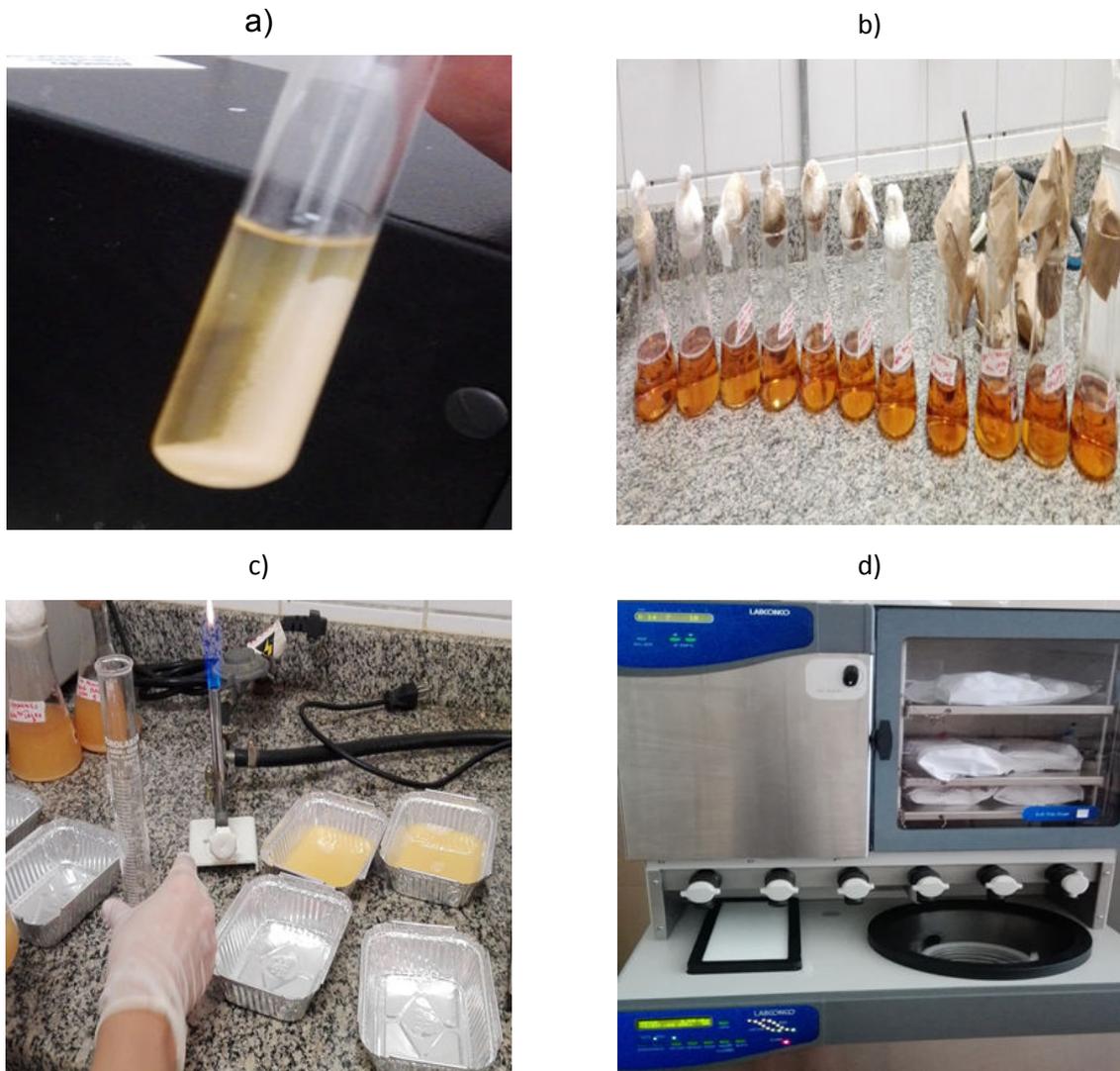


Figura 7 – Etapas da obtenção da cultura de *L. plantarum* BG112 liofilizada. a) *L. plantarum* pré-ativado. b) *L. plantarum* re-incubado. c) Bandejas de alumínio com caldo MRS e *L. plantarum*. d) *L. plantarum* submetido ao processo de liofilização.

Os valores experimentais da curva de crescimento foram ajustados aos dados experimentais e avaliados para obtenção dos parâmetros de crescimento, utilizando o Modelo de Gompertz Modificado (Kalschne et al., 2014). e o ajuste dos dados experimentais ao modelo matemático foram avaliados através dos seguintes índices estatísticos: erro médio quadrático (MSE), fator bias e fator de exatidão. A partir dos dados obtidos em função do tempo, foram calculados os parâmetros microbiológicos

de crescimento, duração da fase lag (λ), velocidade específica máxima de crescimento (μ) e aumento logarítmico da população (A), conforme descrito por Kalschne et al. (2014).

4.2.2 ENCAPSULAÇÃO DO *L. plantarum* BG112

Para otimizar o processo de encapsulação do *L. plantarum* BG112 foi empregado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 considerando como variáveis independentes a proporção de Acrycoat® S100 e a proporção de *L. plantarum* BG112 e como variável dependente o Rendimento e Eficiência da microencapsulação (Tabela 3).

Tabela 3 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional 2^2 com as variáveis codificadas e reais e três repetições no ponto central.

Ensaio	x_1 ($X_1\%$)	x_2 ($X_2\%$)
1	-1 (2,2)	-1 (0,6)
2	+1 (7,8)	-1 (0,6)
3	-1 (2,2)	+1 (1,4)
4	+1 (7,8)	+1 (1,4)
5	-1,41 (1,0)	0 (1,0)
6	+1,41 (9,0)	0 (1,0)
7	0 (5,0)	-1,41 (0,4)
8	0 (5,0)	+1,41 (1,6)
9	0 (5,0)	0 (1,0)
10	0 (5,0)	0 (1,0)
11	0 (5,0)	0 (1,0)

Nota: x_1 , x_2 : valores codificados para as proporções de mistura das variáveis Acrycoat® S100 e *L. plantarum*, respectivamente. ($X_1\%$) e ($X_2\%$): valores reais da concentração ($m.v^{-1}$) das respectivas proporções adicionadas na mistura da suspensão.

O *L. plantarum*, na proporção definida para cada ensaio na Tabela 3, foi dissolvido em 50 mL de água destilada contendo 3 gotas de Tween 80 (surfactante e emulsificante) e mantida sob agitação magnética (Fisatom, modelo 752A, Brasil) por 30 min à temperatura ambiente. O copolímero do ácido metacrílico (CAM) (Acrycoat® S100) foi dissolvido, na proporção definida para cada ensaio conforme Tabela 3, em

150 mL de solução tampão de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) $0,1 \text{ Mol.L}^{-1}$ ($\text{pH} \cong 8,6$) mantido sob agitação magnética (Fisatom, modelo 752A, Brasil) por 30 min à temperatura ambiente. Ambos estão representados na Figura 8a e 8b, respectivamente. A solução de *L. plantarum* BG112 foi misturada com a solução de copolímero do ácido metacrílico (CAM) e agitada mecanicamente (700 rpm) (Fisatom, modelo 713D, Brasil) por 30 min à temperatura ambiente (Figura 8c).

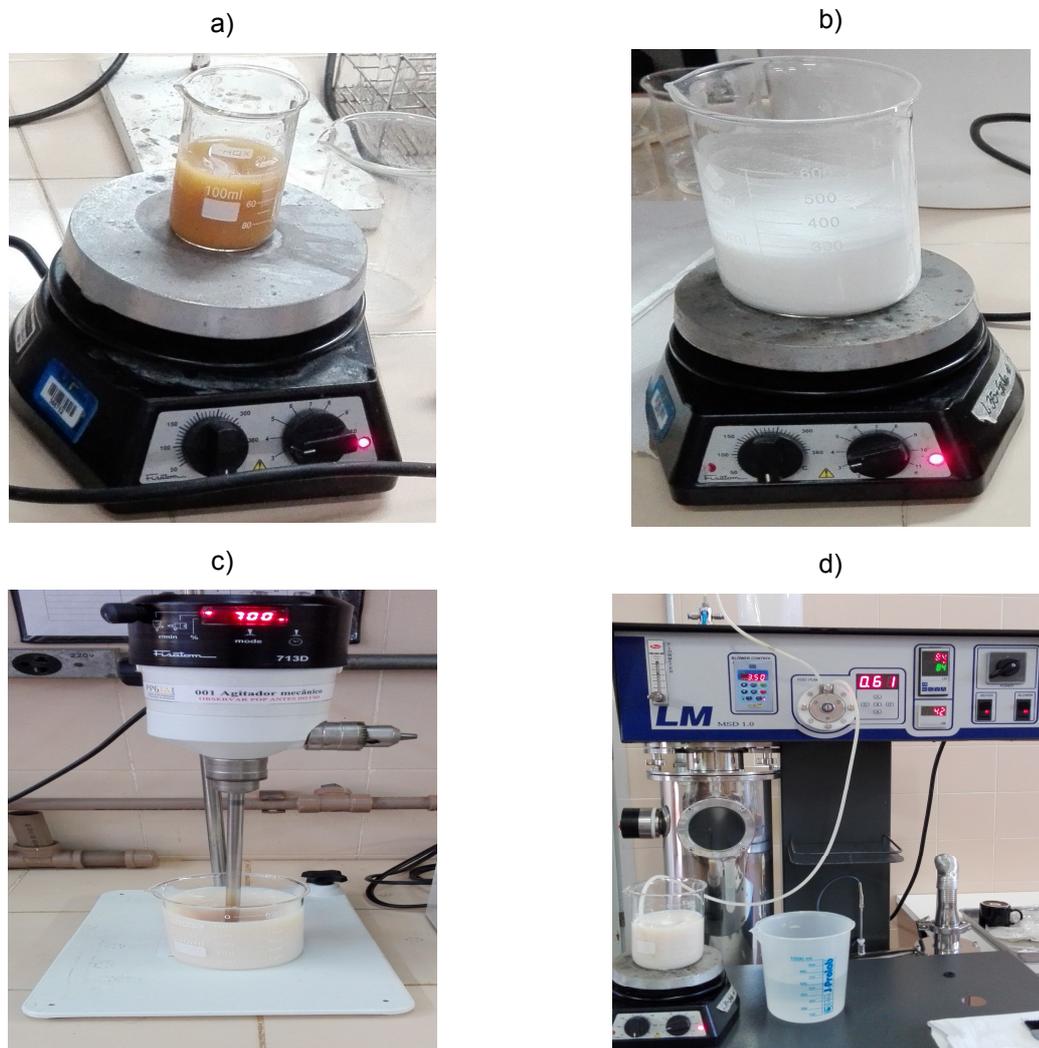


Figura 8 - Encapsulação da cultura de *L. plantarum*. a) Solução *L. plantarum* em agitação magnética. b) Solução copolímero do ácido metacrílico (Acrycoat® S100) em agitação magnética. c) Solução *L. plantarum* e Acrycoat® S100 em agitação mecânica. d) Obtenção das microcápsulas por atomização em secador laboratorial Mini Spray Dryer.

Para a obtenção das microcápsulas realizou-se a secagem da solução por atomização, utilizando um secador laboratorial Mini Spray Dryer (LABMAQ, MSD

1,0, São Paulo, Brasil) com câmara de secagem em aço inox (500 mm × 150 mm), bico atomizador tipo duplo fluido, com orifício de 0,7 mm de diâmetro. A alimentação foi feita através de uma bomba peristáltica, sob condições constantes de pressão do compressor do ar de secagem (2 - 4 kgf.cm⁻²) e vazão do ar comprimido (30 mL.min⁻¹) com vazão de entrada da amostra 0,6 (L.h⁻¹), temperatura do ar de entrada 84 °C e temperatura do ar de saída de 42 °C (Figura 8d). Estas condições operacionais foram fixadas com base em resultados de testes preliminares. As formulações probióticas secas foram coletadas do ciclone em frascos esterilizados e mantidas hermeticamente fechadas sob refrigeração a 4 °C ± 1 °C durante a realização das análises.

4.2.3 VALIDAÇÃO DO PONTO ÓTIMO

Para a validação do ponto ótimo, o *L. plantarum* BG112 foi dissolvido, na proporção 0 (valor codificado) (1,0) (valor real) (m/v, %) em 50 mL de água destilada contendo 3 gotas de Tween 80 e mantida sob agitação magnética (Fisatom, modelo 752A, Brasil) por 30 min à temperatura ambiente. O copolímero do ácido metacrílico (CAM) (Acrycoat[®] S100) foi dissolvido, na proporção 0,2 (valor codificado) (6,4) (valor real) (m/v, %), em 150 mL de solução tampão de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) 0,1 Mol.L⁻¹ (pH ≅ 8,6) mantido sob agitação magnética (Fisatom, modelo 752A, Brasil) por 30 min à temperatura ambiente. A solução de *L. plantarum* BG112 foi misturada com a solução de copolímero do ácido metacrílico (CAM) (Acrycoat[®] S100) e agitada mecanicamente (700 rpm) (Fisatom, modelo 713D, Brasil) por 30 min à temperatura ambiente. O processo de secagem foi realizado como descrito anteriormente para os demais ensaios. Assumiu-se este como décimo segundo ensaio (12).

4.2.4 AVALIAÇÃO DAS MICROCAPSULAS

4.2.4.1 Rendimento da encapsulação

A determinação do Rendimento da encapsulação (RE%) baseou-se na viabilidade das células de *L. plantarum* BG112 utilizadas na solução de alimentação do atomizador e no pó atomizado adaptando-se a metodologia empregada por Picot e Lacroix (2004). Uma alíquota de 1 g de *L. plantarum* BG112 liofilizado empregado na solução de alimentação foi dispersa em 9 mL de ADPT (0,1%) e 1 g de pó atomizado foi dispersa em 9 mL de tampão NaHCO₃ 0,1 Mol.L⁻¹ (pH ≅ 8,6) com agitação intercalada em cada 5 min por vortex (Is logen, Ism 56/4, Brasil) para ambos. Para o pó atomizado substituiu-se a ADPT (1%) pelo tampão NaHCO₃ 0,1 Mol.L⁻¹ (pH ≅ 8,6) com o objetivo de promover a máxima abertura possível das cápsulas considerando a maior solubilidade do Acrycoat nesta faixa de pH, permitindo a quantificação das colônias encapsuladas também. Na sequência, as diluições seriadas foram preparadas e plaqueadas em ágar MRS conforme previamente descrito no item 5.2.1. O Rendimento foi estimado pela Equação 1.

$$RE\% = (N_1/N_0) \cdot 100$$

Equação 1

Onde: N₀ = número de células viáveis da cultura liofilizada utilizada na solução de alimentação do atomizador; N₁ = número de células viáveis no pó obtido dispersas em tampão NaHCO₃ 0,1 Mol.L⁻¹ (pH ≅ 8,6), ambos expressos em log UFC.g⁻¹.

4.2.4.2 Eficiência da encapsulação

A determinação da Eficiência da encapsulação (EE%) foi baseada na viabilidade das células de *L. plantarum* BG112 totais após atomização e viabilidade das células de *L. plantarum* BG112 encapsuladas. Para verificar a contagem de células viáveis não encapsuladas, 9 mL de ADPT (0,1%) foram empregadas para dispersar 1 g do pó, enquanto que para promover a abertura das cápsulas empregou-se 9 mL da solução de tampão NaHCO₃ 0,1 Mol.L⁻¹ (pH ≅ 8,6) com agitação intercalada em cada (5 min) por vortex (Is logen, Ism 56/4, Brasil) para

ambos. Na sequência realizaram-se as diluições seriadas em ADPT (0,1%), plaqueadas em ágar MRS conforme descrito no item 5.2.1. A Eficiência foi calculada pela Equação 2 (PICOT; LACROIX, 2003).

$$EE\% = (N_2 - N_1) * 100 / N_2$$

Equação 2

Onde: N_1 = número de células viáveis no pó obtido, suspensas em ADPT (contagem de células viáveis não encapsuladas); N_2 = número de células viáveis no pó obtido suspensas em tampão NaHCO_3 (contagem de células viáveis totais - encapsuladas e não encapsuladas), ambos expressos em $\log \text{UFC.g}^{-1}$.

4.2.4.3 Morfologia e diâmetro das microcápsulas

Para avaliar a morfologia, as microcápsulas foram enviadas para Universidade Estadual de Londrina (UEL) onde foram observadas e microfotografadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Philips/FEI, modelo Quanta 200). Para o processo de recobrimento das amostras secas em Spray Dryer com ouro, utilizou-se um metalizador (Sputtering BAL-TEC, modelo SCD 050 sputter coater) onde amostra (pós) foi depositada em uma fita dupla de carbono sobre uma chapa de alumínio. Em seguida, foi colocada numa câmara sob vácuo que contém argônio (gás) no seu interior. Este gás liga-se a resíduos que são removidos quando o vácuo é efetuado e é bombeado sobre o ouro em voltagem de 40 V, durante 98 s de deposição para obter-se aproximadamente 15 nm de espessura da camada. Desta forma há circulação dos átomos de ouro em espiral e sua fixação na superfície do material em estudo para garantir a condutividade. Realizou-se o cálculo do diâmetro médio das microcápsulas medindo-se aproximadamente 30 partículas de cada amostra.

4.2.4.4 Propriedades físico-químicas

A umidade das microcápsulas foi determinada gravimetricamente utilizando estufa de secagem (Quimis, modelo q313m, São Paulo, Brasil) a $102\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ até peso constante (AOAC, 2005). A atividade de água foi determinada em analisador de atividade de água por ponto de orvalho com controle interno da temperatura da amostra (Aqualab[®], 4TE, São Paulo, Brasil) após a estabilização das microcápsulas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min. A higroscopicidade foi determinada pesando-se 1 g do pó de cada ensaio armazenado a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ em anaerobiose com uma solução saturada de NaCl (75,3% UR) até atingir o equilíbrio. Após uma semana as amostras foram pesadas e sua higroscopicidade expressa como g de água absorvida por 100 g de pó em base seca ($\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$) (FRITZEN-FREIRE et al., 2012). Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

4.2.4.5 Análise do comportamento térmico

O *L. plantarum* BG112 na forma livre e microencapsulada e o material encapsulante copolímero do ácido metacrílico (CAM) (Acrycoat[®] S100) foram submetidos às análises de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Termogravimetria (TGA) em equipamento STA 6000 (*Simultaneous Thermal Analyser*, Perkin Elmer, Beaconsfield, Reino Unido). Para obtenção das curvas de DSC e TGA, $1,0 \pm 0,2$ mg de amostra foram acondicionadas em cadinhos de alumínio selados, aquecidos de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $600\text{ }^{\circ}\text{C}$, com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e mantidos sob fluxo constante de N_2 ($20\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). O equipamento foi previamente calibrado com padrão de referência de índio. O comportamento térmico foi avaliado com base nas curvas DSC e TGA obtidas.

4.2.4.6 Análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – (FTIR-UATR)

Para verificar a possível interação entre o material encapsulante e o encapsulado, foram determinadas as bandas de absorção do *L. plantarum* BG112

na forma livre e microencapsulada, e do material de parede CAM (Acrycoat S100[®]) na região do infravermelho (FTIR) em equipamento FS 100 (*Frontier Spectrum 100*, Perkin Elmer, Beaconsfield, Reino Unido). Empregou-se o modo de refletância total atenuada (UATR), no intervalo de número de onda de 4000-600 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹, num total de 4 cumulações.

4.2.5 APLICAÇÃO DO *L. plantarum* ENCAPSULADO NA PRODUÇÃO DE SALAME TIPO MILANO

Formulações de salame tipo Milano foram elaboradas seguindo-se as Boas Práticas de Fabricação (BRASIL, 2002) e os padrões previstos pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Salame tipo Milano - Instrução Normativa (IN) nº 22, de 31/07/2000 (BRASIL, 2000), Portaria nº 1004 de 11/12/1998 (BRASIL, 1998) e IN nº 51 de 29/12/2006 (BRASIL, 2006), seguindo-se o processamento e formulação padrão (Tabela 4) descrito por Krummenauer et al. (2015).

Tabela 4 - Formulações de salame do tipo Milano.

Matérias-primas / Ingredientes	SC *(%)	SLPE **(%)
Carne suína (retalho magro)	76,49	76,49
Toucinho suíno lombar	18,00	18,00
Cura Ibrac	0,25	0,25
Ibracor 501	0,30	0,30
Cultura <i>Starter Bactoferm SM 1942</i> ¹	0,04	-
<i>L. plantarum</i> BG112 encapsulado	-	0,10
Sal refinado	2,70	2,70
Açúcar cristal	0,80	0,80
Pimenta branca em pó	0,02	0,02
Alho em pó	0,20	0,20
Vinho tinto seco	1,20	1,20
Total	100,00	100,00

Nota: ¹ Combinação de cepas de *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xyloso*, *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus pentosaceus* e *Debaryomyces Hansenii*

*SC: Salame Controle; **SLPE: Salame com *Lactobacillus Plantarum* Encapsulado

Foram desenvolvidas duas formulações: salame controle (SC), formulação padrão com uso de cultura *starter* comercial e salame com *L. plantarum*

encapsulado (SLPE) em substituição da cultura *starter* comercial. A adição baseou-se no número de células viáveis presentes no pó produzido necessário para atingir na massa do salame o valor mínimo de 10^8 UFC.g⁻¹/10⁸ UFC.mL⁻¹, conforme indicado pela ANVISA (2008).

A carne e o toucinho foram pesados em balança (UDI 20000/2, Urano, Canoas, Brasil), moídos em *cutter* (MADO, GARANT MTK 661, Alemanha) (Figura 9A) por 20 s (granulometria de 5 a 8 mm aproximadamente). Os ingredientes secos e o vinho adicionados à carne moída foram homogeneizados manualmente (Figura 9B). Após, foi adicionado o toucinho picado e a cultura *starter* comercial previamente hidratada em água destilada a 25 °C por 30 min. No caso da formulação em que se adicionou o *L. plantarum* BG112 encapsulado, esse foi hidratado de forma semelhante a cultura comercial e adicionada juntamente como esta. Os salames foram embutidos em embutideira (PCP-10L, Poli, Brusque, Brasil) em envoltórios de celulose com diâmetro de 60 mm (Naturin R2L-D, Viscofan, São Paulo, Brasil), previamente hidratados em água a temperatura de 25 °C por 30 min. Os salames posteriormente foram amarrados (Figuras 9C e 9D) utilizando barbante de poliéster simples e levados para a câmara de maturação e secagem (Réfrica, Girona, Espanha) em uma indústria frigorífica próxima, onde foram maturadas e secadas por aproximadamente 30 dias, conforme parâmetros descritos por Krummenauer et al. (2015) (Figura 9E).



Figura 9 – Aplicação do *L. plantarum* BG112 encapsulado na produção do salame tipo Milano. A) Carne e toucinho moídos em cutter; B) Ingredientes secos e vinho adicionados à massa cárnea; C) Salame controle amarrado e identificado; D) Salame com *L. plantarum* amarrado e identificado; E) Salames em câmaras de maturação em indústria frigorífica.

4.2.5.1 Determinação da curva de pH e perda de peso durante a maturação

Efectuou-se a análise do pH com inserção do electrodo do pHmetro (205, Testo, Campinas, Brasil) diretamente no produto, uma vez ao dia, ao longo de todo período de maturação. A perda de peso (P) foi determinada segundo Krummenauer et al. (2015) considerando a massa inicial e final da maturação, conforme Equação 3.

$$P = (M_0 - M_1) * 100 / M_0 \quad \text{Equação 3}$$

Onde: M_0 = massa inicial; M_1 = massa final.

4.2.5.2 Determinação da composição centesimal e propriedades físico-químicas

Foram determinados em fatias dos salames (Figuras 10a e 10b), os teores de umidade pelo método gravimétrico, lipídios (extrator MARCONI, modelo MA419, São Paulo, Brasil) pelo método soxhlet, proteínas (bloco digestor TECNAL, modelo 040125 e controlador de temperatura TECNAL, modelo TE-007MP, São Paulo, Brasil) utilizando o método de minokjeldahl, e cinzas (mufla JUNG, São Paulo, Brasil) por inceneração com mufla a 550 °C (BRASIL, 1999). A atividade de água a 25 °C em determinador de atividade de água (Aqualab®, 4TE, São Paulo). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

A determinação dos parâmetros de cor luminosidade (L^*), componente verde-vermelho (a^*) e amarelo-azul (b^*), foram realizados tomando dez pontos diferentes de leitura por amostra, utilizando o colorímetro Konica Minolta CR400 (Minolta Corporation, Ramsay, EUA) com esfera de integração e ângulo de visão de 45° e iluminante D calibrado no branco.

A análise instrumental da textura foi realizada no texturômetro (TA.XT/Plus/50, Stable Micro System, Godalming, Reino Unido). As amostras foram cortadas em cubos de 20 mm submetidas à determinação da força de cisalhamento

com *probe* HDP/WBV, velocidade de teste de 2,0 mm seg⁻¹ e força aplicada de 5 g. Foram realizadas 10 medições para cada salame.



Figura 10 - Fatias de amostra dos salames em análise. a) Salame com *L. plantarum* BG112 encapsulado (SLPE). b) Salame controle (SC).

4.2.5.3 Determinações microbiológicas

A contagem de bactérias ácido-láticas e contagem total de mesófilas nas amostras de salame (SC e SLPE) foram efetuadas, conforme descrito por Kalschne et al. (2015). 25 g dos salames foram dispostas em plásticos estéreis contendo 225 mL ADPT (0,1%), seguidos de homogeneização. Foram feitas as diluições seriadas e 1 mL de cada diluição foi plaqueada em profundidade com sobrecamada de ágar MRS e PCA. As placas foram incubadas de forma invertida por 48 h a 30 °C. Para a amostra de salame adicionada de *L. plantarum* BG112 encapsulado, fez-se a contagem conforme Kalschne et al. (2015).

As análises de pesquisa de *Salmonella* spp., contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, Coliformes a 45 °C e Clostridium sulfito redutor a 46° C foram realizadas conforme metodologia descrita por Silva et al. (2010). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.6 ANÁLISE SENSORIAL

Os salames foram analisados microbiologicamente, conforme descrito no item 4.2.5.3 e somente foram submetidos à avaliação sensorial quando constatado que os produtos estavam dentro dos parâmetros estabelecidos pela Legislação (BRASIL, 2001).

As análises sensoriais foram realizadas no laboratório de Análise Sensorial após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE 56836316.2.0000.0092). A divulgação dos testes foi realizada por contato pessoal. Os participantes recrutados englobaram alunos, professores e funcionários da UTFPR, consumidores regulares de embutidos para garantir a não ocorrência de qualquer tipo de problema com o consumo. Todos os participantes foram informados que provariam salames contendo probióticos, preparados de forma similar ao preparo padrão, sobre o período de duração dos testes e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) específico para a participação nos estudos. Na sequência responderam a um questionário sobre informações de faixa etária, sexo, escolaridade e hábitos de consumo referentes a salames/embutidos, para caracterização da equipe.

As duas amostras de salames frios foram fatiados finos em fatiadora automática, sendo as fatias dispostas em pratos de plástico branco, e servidos monadicamente codificados com três dígitos aleatórios. Juntamente com as amostras, foi servido água potável e biscoito de água e sal. As análises foram feitas em cabines individuais sob luz branca.

Cento e quarenta e um provadores avaliaram a aceitação sensorial das amostras, considerando os atributos de cor, aroma, textura, sabor e aceitação global, empregando a escala hedônica híbrida de 10 cm (VILLANUEVA; PETENATE; DA SILVA, 2005). Um delineamento experimental completamente balanceado e randomizado foi utilizado. Na sequência foi avaliada a intenção de compra dos salames, considerando-se as mesmas condições descritas para o teste da escala hedônica.

4.2.6.1 Teste pareado preferência

A duas amostras de salame foram servidas juntas e avaliadas quanto a preferência. Os consumidores foram solicitados para indicar a amostra mais preferida, circulando o código de três dígitos correspondente à mesma. Empregou-se um delineamento experimental completamente balanceado e randomizado.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O planejamento do DCCR para otimização da encapsulação da cultura foi avaliado utilizando a metodologia de superfície de resposta com o auxílio do *software Statistica 8.0* (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média (DP). O ajuste da equação do modelo de segunda ordem foi expresso pelo coeficiente de determinação R^2 , e a significância estatística determinada pelo Teste F (análise de variância – ANOVA, $p \leq 0,05$), sendo considerada a melhor condição de encapsulação aquela com maior Rendimento e Eficiência. Os efeitos das variáveis sobre a resposta tamanho das partículas também foram avaliados.

Os parâmetros atividade de água, umidade e higroscopicidade das micropartículas foram expressos como média \pm desvio padrão da média (DP) e avaliados por ANOVA, considerando a amostra como causa de variação, e teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para comparação de médias. Para os parâmetros de perda de peso, atividade de água, cor, textura e teores de umidade, lipídios, proteína e cinzas das duas amostras de salames, os resultados (expresso como média (\pm DP)) foram avaliados e comparados utilizando o teste t ($p \leq 0,05$). Todas as análises foram feitas utilizando o programa Statistica 8.

Os resultados das análises sensoriais, para a escala hedônica foram expressos como média \pm desvio padrão da média (DP) e as médias comparadas por ANOVA, considerando a amostra e o julgador como causas de variação ($p \leq 0,05$), utilizando o programa Statistica 8.0. Já para o teste pareado preferência, os julgamentos para cada amostra foram somados e as somas obtidas comparadas

com o valor mínimo de julgamentos para uma amostra para estabelecer preferência significativa ($\leq 0,05$) estimado conforme ROESSLER et al. (1978)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DA CULTURA DE *L. plantarum* BG112 LIOFILIZADA

Os dados experimentais obtidos na elaboração da curva de crescimento do *L. plantarum* BG112 (Figura 11) foram ajustados ao Modelo de Gompertz Modificado descrito como um modelo matemático com bom ajuste para bactérias ácido-láticas (KALSCHNE et al. 2014).

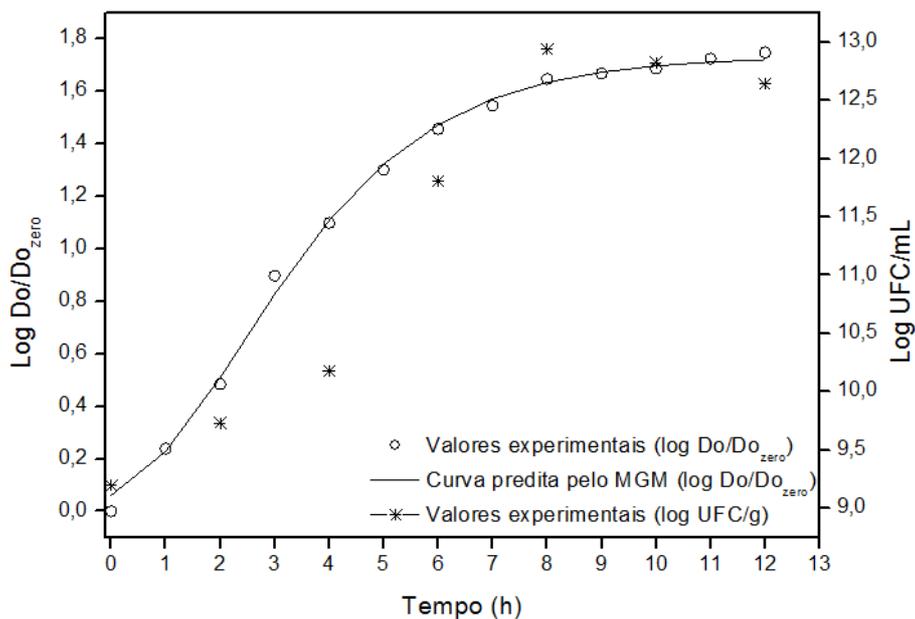


Figura 11 – Curva de crescimento do *L. plantarum* obtida utilizando o Modelo de Gompertz Modificado.

A duração da fase lag (λ) predita pelo Modelo foi de 0,42 min, a velocidade específica máxima de crescimento (μ) foi $0,32 \text{ h}^{-1}$ e a população máxima atingida (A) foi $1,74 \text{ log Do/Do}_{\text{zero}}$. Verificou-se que os valores experimentais ficaram ajustados ao Modelo de Gompertz modificado considerando que um R^2 de 0,99, erro médio quadrático (MSE) de 0,00, Fator bias de 1,00 e Fator de exatidão de 1,03.

O plaqueamento dos pontos da curva de crescimento evidenciou que no tempo zero a contagem de *L. plantarum* BG112 era de $9 \text{ log UFC.mL}^{-1}$ e, após 8 h

até 12 h de incubação a 30 °C em caldo MRS, atingiu contagens superiores a 12 log UFC.mL⁻¹, chegando à fase estacionária. Este resultado está de acordo com os estudos de Anekella; Orsat (2013) e de Pispan; Hewitt; Stapley (2013), nos quais estudaram a cultura de *L. acidophilus*, que apresenta semelhante comportamento do *L. plantarum*, em que atingiu a fase estacionária após 13 h em incubação em caldo MRS a 30 °C.

O conhecimento do tempo de duração da fase estacionária é de fundamental importância, pois é o ponto que se deve encerrar a fermentação quando o objetivo é microencapsular para a utilização como cultura *starter*. No final dessa fase todas as células estão metabolicamente ativas e a concentração celular atinge o seu máximo (PELCZAR Jr; CHAN; KRIEG, 1996).

Após liofilização da cultura foram realizadas as diluições seriadas e o plaqueamento em ágar MRS, conforme previamente descrito no item 4.2.1 verificando-se contagens superiores a 10⁷ UFC.mL⁻¹ como desejado, atingindo o valor máximo de 14 log UFC.mL⁻¹.

5.2 AVALIAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS

5.2.1 Rendimento e Eficiência de Encapsulação e Validação do Ponto Ótimo

Para avaliar a influência conjunta das variáveis concentração de Acrycoat® S100 e *L. plantarum* BG112 aplicou-se um planejamento fatorial 2² completo, com quatro pontos fatoriais (níveis ±1), quatro pontos axiais (níveis ± α) e três pontos centrais (nível 0). A Tabela 5 mostra as variáveis codificadas e reais (x₁ (X₁%); x₂ (X₂)) e os resultados das variáveis dependentes para cada ensaio efetuado (RE%; EE%).

Observando a Tabela 5 verifica-se que os maiores valores de RE% e EE% foram conseguidos nos ensaios 9 (37,1%; 80,0%), 10 (39,3%; 86,8%) e 11 (33,8%; 77,0%), respectivamente, correspondentes aos pontos centrais do planejamento do

processo de encapsulação por atomização. Isso mostra que existe uma região do ótimo bem estabelecida.

Tabela 5 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com as variáveis do processo (codificadas e reais) com as respostas Rendimento de encapsulação (RE%) e Eficiência de encapsulação (EE%).

Ensaio	x_1 (X ₁ %)	x_2 (X ₂ %)	(RE%)	(EE%)
1	-1 (2,2)	-1 (0,6)	6,5±0,24	36,2
2	+1 (7,8)	-1 (0,6)	0,5±0,01	17,6
3	-1 (2,2)	+1 (1,4)	23,6±0,42	0,8
4	+1 (7,8)	+1 (1,4)	10,6±0,18	56,5
5	-1,41 (1,0)	0 (1,0)	10,3±0,71	6,1
6	+1,41 (9,0)	0 (1,0)	1,5±0,24	57,3
7	0 (5,0)	-1,41 (0,4)	0,6±0,00	43,4
8	0 (5,0)	+1,41 (1,6)	2,6±0,02	2,5
9	0 (5,0)	0 (1,0)	37,1±0,45	80,0
10	0 (5,0)	0 (1,0)	39,3±1,66	86,8
11	0 (5,0)	0 (1,0)	33,8±2,82	77,0

Nota: x_1 , x_2 : valores codificados para as proporções de mistura das variáveis Acrycoat[®] S100 e *L. plantarum* BG112, respetivamente; (X₁%) e (X₂%): valores reais da concentração (m/v) das respetivas proporções adicionadas na mistura da suspensão

Uma vez que este cálculo representa as células viáveis após abertura das cápsulas em solução tampão NaHCO₃ 0,1 Mol.L⁻¹ (pH \cong 8,6) conseguiu-se verificar que o processo foi bem sucedido. O pH desta solução tem um valor próximo daquele que se encontra no intestino humano. As enzimas que atuam no intestino precisam de pH levemente alcalino (pH de 8 a 9) para funcionar. Dentre os sucos digestivos que participam do processo de digestão de alimentos, é o suco pancreático (pH entre 8,5 e 9) que apresenta maior número de enzimas digestivas promissoras de romper as microcápsulas e libertar o *L. plantarum* no lugar pretendido. Aliado a este suco, encontra-se também o secretado pela bÍlis onde seu pH oscila entre 8,0 e 8,5, demonstrando que uma boa Eficiência de encapsulação também será necessária além de um bom Rendimento. Esposito (2002) enuncia que micropartículas podem ser utilizadas para a entrega de ácido ascórbico na parte inferior do intestino, no jejuno e no íleo uma vez que resistem aos pH encontrados nessa região.

Os resultados de Rendimento (Tabela 5) foram inferiores aos obtidos por autores como Chávez-Ledeboer (2007) atingiram 44% no Rendimento ao encapsular *B. lactis* Bb12 com isolado proteico e maltodextrina empregando temperaturas de

80°C; Lapsiri, Bhandari; Wanchaitanawong (2012) na microencapsulação de *L. plantarum* utilizando proteína isolada de soja e trealose, cujo rendimento foi de 57,7%. Contudo, foram superiores a autores como Da Silva (2009) que conseguiu valores de Redimento de apenas 19,93% em micropartículas de xilana revestidas com Eudragit® S100.

Sabe-se que nos primeiros instantes de processo ocorre uma grande adesão do material às paredes da câmara, sendo que no caso do presente estudo, o objetivo de se fazer essa análise foi o de destacar a importância do Acrycoat® S100 na proteção à secagem por atomização. Nessa secagem, o Rendimento é dependente do produto que será seco, da proporção em que se encontra o material e das condições de processo empregadas, diferentemente, por exemplo, de processos como a liofilização, na qual as perdas são desprezíveis e espera-se máximos Rendimentos.

A Eficiência, por sua vez, traduz-se na qualidade do material que se conseguiu atingir, ou seja, a determinação da quantidade real de *L. plantarum* encapsulado eficazmente ao final do processo de microencapsulação. Para se conhecer a quantidade real deste micro-organismo presente nas microcápsulas, uma vez que perdas do material ativo podem ocorrer durante a formação das mesmas, o seu cálculo baseou-se na viabilidade das células de *L. plantarum* atomizadas em pó com abertura e sem abertura/com abertura parcial das cápsulas. Assim se pode explicar igualmente valores baixos de RE% mas altos de EE%, como é o caso dos ensaios 1 (6,5%; 36,2%), 2 (0,5%; 17,6%), 6 (1,5%; 57,3%) e 7 (0,6% 43,4%) respectivamente, (Tabela 5) indicando possíveis perdas operacionais durante o processo e sugerindo baixa estabilidade na suspensão obtida devido as variações a que estão sujeitos. Estes também revelam que o aumento da concentração do encapsulante para porções acima das utilizadas nos pontos ótimos, não favoreceram o Rendimento de encapsulação da bactéria. Muitas vezes, para alcançar bons resultados e desta forma também evitar a sobredosagem do material encapsulante objetiva-se a qualidade dos resultados obtidos em detrimento de altas quantidades conseguidas.

Uma combinação desta informação, com o conhecimento do comportamento de *L. plantarum* pode dar uma visão mais ampla nos mecanismos subjacentes à saúde ao promover propriedades e possíveis novas funções desta bactéria (HOLZAPFEL et al., 2001).

Na Tabela 6 podem ser visualizados os efeitos principais (linear e quadrático) e suas interações (linear), p-valores, os coeficientes de regressão da equação polinomial e os coeficientes de determinação (R^2), para as respostas de Rendimento (RE) e Eficiência (EE). Consideraram-se nos modelos para ambas as respostas, todos os termos significativos ($p \leq 0,05$) e também termos que embora não significativos ($p > 0,05$), promoviam redução no R^2 ao serem removidos, justificando sua importância para as respostas.

Tabela 6 - Efeitos estimados, p-valores, coeficientes de regressão e equações dos modelos para o RE e EE de encapsulação do *L. plantarum*.

Resposta	Variáveis	Efeito	Erro puro	t	p-valor	Equação
Rendimento (RE)	Média	36,73	1,58	23,19	0,0019	$Y = 36,73 - 3,93 x_1 - 13,80 x_1^2 + 3,76 x_2 - 15,97 x_2^2$ $R^2 = 0,9176$ $R_{ajustado} = 0,8627$
	X1(L)	-7,86	1,94	-4,05	0,0560	
	X1(Q)	-27,61	2,32	-11,91	0,0070	
	X2(L)	7,52	1,94	3,87	0,0607	
	X2(Q)	-31,94	2,32	-13,78	0,0052	
Eficiência (EE)	Média	81,15	2,92	27,81	0,0013	$Y = 81,15 + 13,70x_1 - 24,67 x_1^2 - 29,09 x_2^2 + 18,60 x_1x_2$ $R^2 = 0,8982$ $R_{ajustado} = 0,8303$
	X1(L)	27,40	3,58	7,65	0,0166	
	X1(Q)	-49,34	4,27	-11,55	0,0074	
	X2(Q)	-58,17	4,27	-13,62	0,0053	
	X1x2	37,19	5,06	7,36	0,0180	

Nota: Y= variável de resposta; x_1 = Acrycoat[®] S100 (% m.v⁻¹); x_2 = *L. plantarum* BG112 (% m.v⁻¹); L - termo linear; Q - termo quadrático.

Para ambas as respostas, RE e EE, obtiveram-se efeitos negativos significativos ($p \leq 0,05$) para os termos quadráticos de ambas as variáveis, indicando que a faixa abordada no estudo realmente está na região ótima para as respostas e que o ponto ótimo localiza-se próximo ao ponto central, com leves deslocamentos, para os quais deve-se considerar os termos lineares (Tabela 6).

Em relação à resposta RE, pode observar-se pelos efeitos (Tabela 6) que com exceção da interação, os termos lineares foram significativos ($p \leq 0,05$) ou muito próximos com importância para a resposta, como é o caso do termo x_2 (L), com contribuição positiva. O contrário verifica-se no termo x_1 (L) o qual apresentou

contribuição negativa. Indicando, portanto, que um aumento no rendimento de encapsulação poderá ser conseguido, utilizando-se para variável x_1 (% de Acrycoat) concentrações próximas ao ponto central com leve deslocamento para o nível -1, enquanto que para a variável x_2 (% de *L. plantarum*), também concentrações próximas ao ponto central, no entanto, com leve deslocamento para o nível +1.

Já para a resposta EE, com exceção do termo x_1 (L), todas as variáveis foram consideradas estatisticamente significativas, além da interação entre as mesmas (x_1x_2). Indicando que um aumento desta resposta poderá ser conseguido com concentrações próximas ao ponto central com leve deslocamento para o nível +1, especialmente para a variável x_2 (% de *L. plantarum*).

As equações representativas do modelo quadrático das variáveis em estudo estão expostas na mesma Tabela 6, com os respectivos R^2 .

A análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 7 mostra os índices estatísticos para avaliação dos modelos de Rendimento e Eficiência utilizando os valores de $F_{\text{calculado}}$, F_{tabelado} para validade do modelo, e os coeficientes de determinação R^2 , R_{ajustado} e o Resíduo mostrando a magnitude do erro experimental permitindo corroborar a significância do modelo obtido.

Tabela 7 - Análise de Variância (ANOVA) dos modelos quadráticos para as respostas Rendimento e Eficiência de encapsulação.

Causa de Variação	Soma de Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Quadrado Médio (QM)	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}	p-valor
Rendimento*						
Regressão	2731,75	4	682,94	20,96	4,53	0,0011
Resíduo	195,51	6	32,59			
Falta de ajuste	180,459	4	45,11	6,00	19,25	0,1480
Erro puro	15,048	2	7,52			
Total	2927,260	10	682,94	20,96		
Eficiência**						
Regressão	11028,50	4	2757,13	15,82	4,53	0,0024
Resíduo	1045,93	6	174,32			
Falta de ajuste	994,82	4	248,71	9,73	19,25	0,0953
Erro puro	51,11	2	25,55			
Total	12074,43	10				

Nota: * $R^2=0,9176$; $R_{\text{ajustado}}=0,86266$ ** $R^2=0,8982$; $R_{\text{ajustado}}=0,8303$

Na tabela 7 o percentual de variação (R^2) é dado por $\approx 0,92\%$ para o Rendimento e $\approx 0,90\%$ para a Eficiência com $p < 0,05$. No entanto o ajuste nas variações de percentual do modelo referentes a ambos resultam em uma queda destes valores para $\approx 0,90\%$ e $\approx 0,83\%$, respectivamente. Ambos os modelos foram considerados adequados e válidos para representar as respostas, uma vez que o valor de F_{tabelado} ($F_{4,6}=4,53$) foi menor que o $F_{\text{calculado}}$ (20,96) para Rendimento e o valor de F_{tabelado} ($F_{4,6}=4,53$) foi menor que o $F_{\text{calculado}}$ (15,82) para Eficiência. Os valores dos Resíduos (195,51; 1045,93 respectivamente), foram baixos quando comparados com a Regressão (2731,75; 11028,50) respectivamente, indicando boa reprodutibilidade da análise e não existindo evidências para rejeitar a hipótese de normalidade. Com os valores significativos ($p \leq 0,05$) mostra-se um estudo preditivo em ambas as respostas e com ajuste aos dados experimentais.

Desta forma, foram conseguidas as superfícies de resposta e as curvas de contorno para o comportamento do Rendimento e da Eficiência da microencapsulação, frente à razão entre os dois componentes participantes da encapsulação (Figura 12), confirmando-se os efeitos observados anteriormente.

Portanto, por meio da derivação dos modelos ajustados para ambas as respostas, RE e EE, estimaram-se as condições ideais das variáveis estudadas visando maximizar RE e EE (Tabela 8).

Considerando-se a resposta Eficiência como parâmetro principal para o efeito probiótico no produto proposto salame tipo Milano, efetuou-se a validação do modelo repetindo-se o processo de encapsulação nas condições ótimas, ou seja, com x_1 no nível 0,2 ($X_1=6,4\%$ de CAM, $m.v^{-1}$) e x_2 no nível 0 ($X_2=1\%$ de *L. plantarum*, $m.v^{-1}$), obtendo-se uma Eficiência de encapsulação média de 89,9%, valor este 8,2% maior que o estimado pelo modelo ajustado (83,1%).

Ao conseguir definir esta região numa superfície de resposta pôde-se compreender como as mudanças nas proporções das variáveis afetaram a resposta à encapsulação, determinaram os níveis das variáveis que otimizaram a resposta pretendida e mostraram que as condições operacionais de 84 °C de temperatura de entrada do ar e 0,6 L.h⁻¹ na vazão de alimentação, atenderam de forma eficaz às especificações pretendidas (capacidade do copolímero em encapsular).

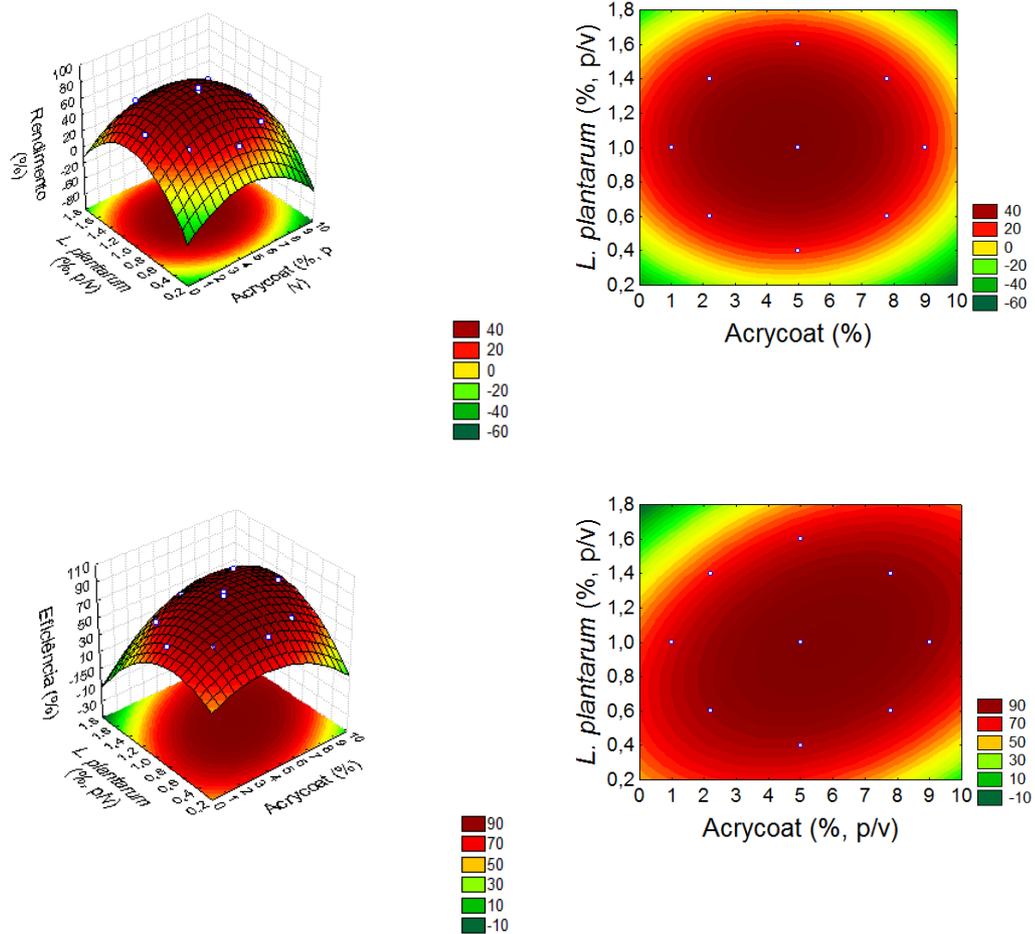


Figura 12 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para o Rendimento (RE%) e Eficiência (EE%) de encapsulação em função da razão Acrycoat S100 / *L. plantarum* (% m.v⁻¹).

Tabela 8 - pontos ótimos para a resposta Rendimento de encapsulação (RE%) e Eficiência de encapsulação (EE%).

Variáveis codificados	(RE%)	(EE%)
X ₁	-0,1	0,2
X ₂	0,1	0,0

Nota: RE%: Rendimento de encapsulação; EE%: Eficiência de encapsulação.

Trabalhos como o de Chávez e Ledebor (2007) relatam um valor de 44% de Rendimento obtido ao microencapsular *B. lactis* bb12 em isolado proteico de soja e maltodextrina, empregando temperatura de secagem de 80 °C, próxima da utilizada neste estudo. Para Chatterjee e Bhattacharjee (2013) valores médios relatados são de 62% para Eficiência de encapsulação de micropartículas de extrato de cravo rico em eugenol encapsulado em matrizes de maltodextrina e goma-arábica, utilizando a técnica de atomização, com uma proporção de 1:4,8:2,4 de extrato de cravo:maltodextrina: goma-arábica. Esses resultados foram similares aos obtidos

para o ponto central do trabalho de Veiga (2015) ao microencapsular eugenol em carragena combinada com proteínas do leite, do farelo de arroz e albumina sérica bovina por atomização (37,9% RE e 69,4% EE).

A escolha correta do material de parede e a proporção ideal em que se aplica, afetam particularmente a Eficiência do processo, o grau de proteção do núcleo ativo, a quantidade adquirida e a estabilidade das micropartículas (NAZZARO et al., 2012; GHARSALLAOUI et al., 2007).

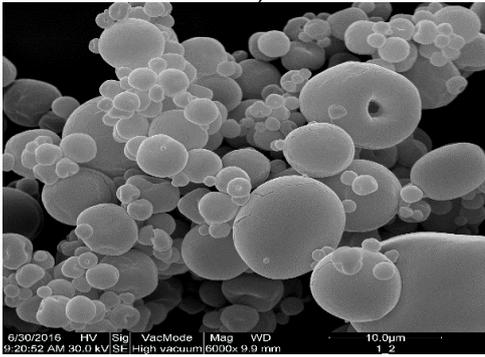
5.2.2 Microscopia

A Figura 13 mostra as microcápsulas produzidas por atomização. O MEV revela ausência de células livres do micro-organismo *L. plantarum* BG112, confirmando a eficiente microencapsulação da bactéria pelo copolímero do ácido metacrílico (CAM) (Acrycoat® S100).

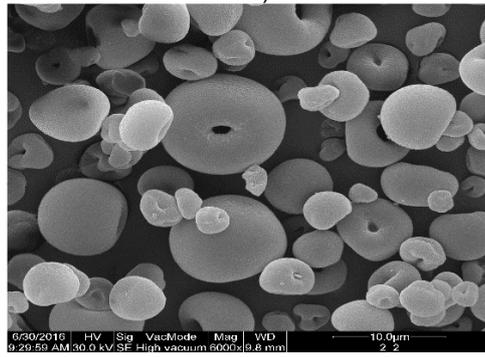
Independente da proporção do encapsulante, as micropartículas tiveram aparências semelhantes, à exceção do ensaio 5 que foi o que saiu fora do padrão observado (Figura 13). As superfícies externas mostraram paredes contínuas, sem fissuras, rachaduras ou interrupções, com uma forma esférica e oval em vários tamanhos, com concavidades na região central. Estas concavidades são típicas de materiais produzidos por secagem por atomização, que é um atributo essencial para garantir uma maior proteção ao recheio (KHA et al., 2014; AGHBASHLO et al., 2013; SILVA et al., 2013).

Saézn et al. (2009) e Khem, Small e May (2016) relataram que a formação de concavidades na superfície de partículas atomizadas pode ser atribuído ao encolhimento das partículas durante o processo de secagem devido à rápida evaporação das gotas de líquido.

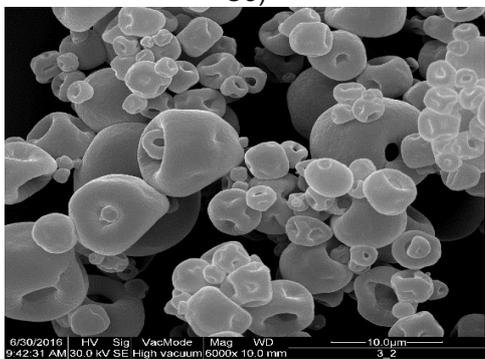
A1)



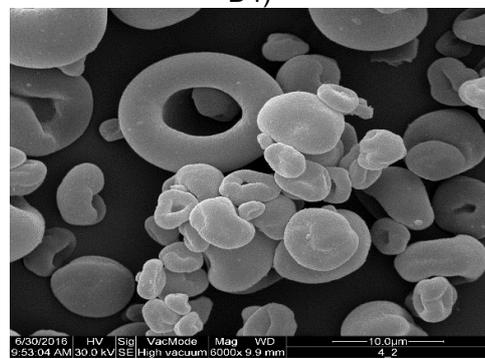
B2)



C3)



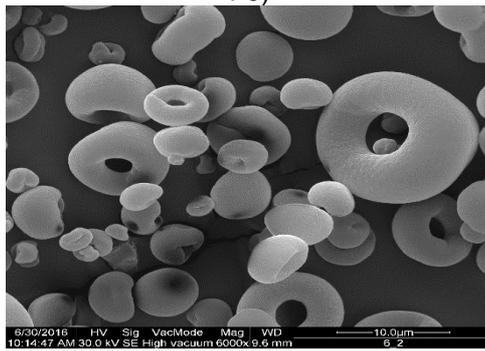
D4)



E5)



F6)



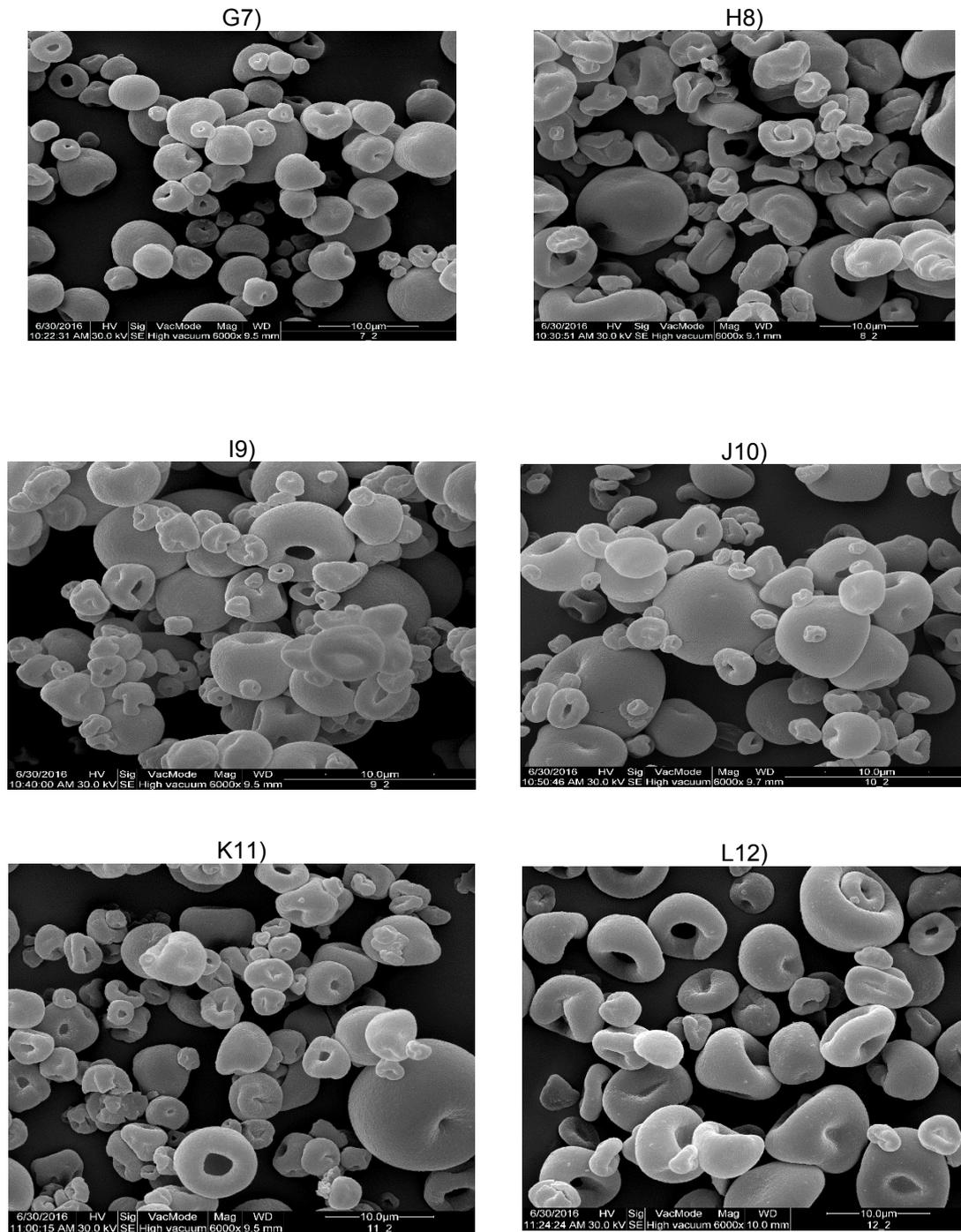


Figura 13 –Imagens obtidas no MEV das microcápsulas de *L. plantarum* BG 112 encapsulado com resolução de 10 μm. Estão ordenadas da letra A a L com os respectivos números dos ensaios correspondentes.

Para as micropartículas que apresentaram concavidade saliente (colapso) indica que o revestimento não teve elasticidade suficiente durante o processo para cobrir o núcleo. Baranauskiene et al. (2005) encontraram aspetos morfológicos

semelhantes para revestimento de óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare* L.) utilizando concentrado proteico de soro de leite onde as suas micropartículas continham superfícies com concavidades profundas. Estas formas de superfície poderão sugerir também que microesferas do tipo matriz foram obtidas. Estes tipos de microsferas são produzidos quando tanto o núcleo como o invólucro são hidrofílicas, portanto, eles se misturam para formar a parede da microsfera, fundamento este é apoiado por Favaro-Trindade et al. (2010). Ou, ao contrário, conforme verificado por Khem, Small e May (2016) em que as células bacterianas são hidrofóbicas tal como o material encapsulante, e portanto, há hipótese de os dois interagirem hidrofobicamente e consolidar o material formado, como pode ter provavelmente ocorrido entre as células de *L. plantarum* e o copolímero do ácido metacrílico (CAM).

Também se visualiza a junção das partículas em aglomerados e a presença de partículas pequenas dentro de outras de maior dimensão. Semelhante aglomeração foi observada por Palmieri et al. (2001) em micropartículas secas por atomização contendo paracetamol encapsulado com Eudragit® RS. Segundo Khem, Small e May (2016), a agregação das micropartículas podem ocorrer devido as interações hidrofóbicas entre radicais do próprio material encapsulante.

Micropartículas e nanopartículas são comumente encontradas em vários tipos de produtos alimentares.

O tamanho de partícula é uma das características mais importantes de sistemas de entrega à base de biopolímero e copolímeros (JOYE; McCLEMENTS, 2014).

São diversos os fatores que podem influenciar no tamanho das partículas, como por exemplo, parâmetros do processo de secagem, composição da matriz e do conteúdo, proporção da mistura (conteúdo/revestimento), entre outros (HEURTAULT et al., 2003). Autores como Gharsallaoui et al. (2007) acrescentam a viscosidade do meio; a presença de componentes ativos de superfície; o total de sólidos do meio de secagem; o tipo de atomizador e o diâmetro do bocal.

Geralmente as cápsulas podem ser classificadas de acordo com o seu tamanho: macrocápsulas (>5,000 μm), microcápsulas (0,2 a 5,000 μm) e nanocápsulas (<0,2 μm) (Da Silva, 2014). O mesmo autor em adaptação de Favaro-Trindade (2008) mostra alguns métodos aplicados de encapsulação com o tamanho

das cápsulas produzidas pelos mesmos, onde para atomização o valor encontra-se de 5-150 μm .

A Tabela 9 apresenta o diâmetro maior e menor obtido por atomização para as partículas de cada ensaio efetuado para uma amostragem de 120 cápsulas de cada ensaio.

Tabela 9 - Diâmetro médio das microcápsulas de *L. plantarum* produzidas pelo processo de atomização.

Ensaio	x1 (X1%)	x2 (X2%)	Diâmetro menor (μm)	Diâmetro Maior (μm)	Diâmetro médio \pm DP (μm)
1	-1 (2,2)	-1 (0,6)	1,09	11,79	3,71 \pm 2,80
2	+1 (7,8)	-1 (0,6)	2,43	11,20	5,88 \pm 2,21
3	-1 (2,2)	+1 (1,4)	0,97	10,00	4,26 \pm 2,55
4	+1 (7,8)	+1 (1,4)	3,98	14,99	6,41 \pm 2,89
5	-1,41 (1,0)	0 (1,0)	1,74	8,14	4,68 \pm 2,17
6	+1,41 (9,0)	0 (1,0)	2,90	15,25	6,39 \pm 3,21
7	0 (5,0)	-1,41 (0,4)	2,29	7,23	4,41 \pm 1,00
8	0 (5,0)	+1,41 (1,6)	2,22	11,27	5,79 \pm 2,77
9	0 (5,0)	0 (1,0)	1,96	9,94	4,34 \pm 2,59
10	0 (5,0)	0 (1,0)	1,69	12,76	4,71 \pm 2,59
11	0 (5,0)	0 (1,0)	1,83	14,29	4,59 \pm 2,15
12	0,2 (6,4)	0 (1,0)	2,35	11,08	6,28 \pm 2,34

Nota: x1, x2: valores codificados para as proporções de mistura das variáveis Acrycoat S100 e *L. plantarum*, respectivamente; (X1%) e (X2%): valores reais da concentração (m.v^{-1}) das respectivas proporções adicionadas na mistura da suspensão.

O tamanho das partículas variou de 0,97 μm a 3,98 μm para o menor diâmetro e 7,23 μm a 15,25 μm para o maior diâmetro. Com esta variação verificou-se que tanto a quantidade de CAM (Acrycoat[®] S100) como de *L. plantarum* pode ter influenciado nos diferentes tamanhos obtidos. Por meio da análise dos efeitos das variáveis, verificaram-se efeitos positivos com significância ($p < 0,05$, $R^2 = 0,9179$) tanto para o termo linear (1,67) como quadrático (0,87) para variável quantidade de Acrycoat[®] S100 e para o termo linear (0,74) para a variável quantidade de *L. plantarum* na suspensão de atomização. Indicando, para a faixa estudada, que o aumento das quantidades de ambas as variáveis, proporcionou cápsulas de maior diâmetro. O que pode ser evidenciado nos ensaios 2, 4, 6 e 8, cujas misturas levaram a produção de emulsões mais viscosas e formação de partículas de maior tamanho. Em contraste a reduzida quantidade revelou-se em aglomerados deformados visualizados no ensaio 5. Poderá também ter influenciado o diâmetro do bico escolhido do atomizador (0,7 mm) (OKURO, 2013). Carneiro et al. (2013),

relataram que maior viscosidade do meio transportador resultou em maiores gotículas formadas durante a atomização e, conseqüentemente, partículas maiores após a secagem.

Segundo Heidebach et al. (2009) a adição de partículas na formulação de alimentos pode influenciar diretamente a parte sensorial destes sendo que em tamanho reduzido evitam um impacto negativo.

Fang e Bhandari (2010) afirmaram que valores entre 10 a 100 μm são os esperados para microcápsulas obtidas pela secagem por atomização. Para Hansen et al. (2002) valores de tamanho inferiores a 100 μm são desejáveis a fim de evitar uma influência negativa a nível de textura e assim permitir a sua adição a vários tipos de alimentos.

Em contra partida, Chandramouli et al. (2004) defenderam que se o tamanho da partícula for muito reduzido as matrizes encapsulantes podem não conseguir ser eficazes na proteção exercida do seu conteúdo, observando que em condições gástricas a viabilidade do micro-organismo *Lactobacillus* spp, era tanto maior quanto maior o diâmetro da cápsula. Este elevado tamanho poderá também influenciar nas propriedades físicas que as caracterizam, como é o caso da higroscopicidade. Como relatado por Tonon et al. (2009), quanto maior for o tamanho de partícula, menor a área de superfície exposta e, por conseguinte, mais baixa é a adsorção de água a partir do ar ambiente.

Desta forma os valores obtidos estão dentro do que se pode esperar na aplicação de um processo de secagem para encapsulação de micro-organismos com formação de pós e assim aptos a ser aplicados em alimentos.

5.2.3 Propriedades físicas

Na Tabela 10 são apresentadas as características das microcápsulas quanto à sua umidade, atividade de água e higroscopicidade.

Na maioria dos casos relatados na literatura, a sobrevivência de culturas probióticas secas por atomização à temperatura ambiente ou temperaturas mais elevadas relaciona-se com a estabilidade limitada destas durante o armazenamento. Normalmente, os probióticos são secos a altas temperaturas no processo de

atomização, frequentemente acima de 100°C e 60°C, na entrada e saída de ar quente, respectivamente, sendo a causa mais provável da baixa sobrevivência, assim como as rápidas taxas de secagem que produzem igual efeito de insatisfação (LI et al., 2006). Tem sido demonstrada que variam entre as estirpes de probióticos *Lactobacillus* (GARDINER et al., 2000). Para Chávez e Ledebor (2007) este parece ser o desafio mais difícil a ser superado antes de aplicar os probióticos secos em alimentos industrializados. Os autores Ananta, Volkert e Knorr (2005) mencionaram que quer para utilização como um alimento complementar ou como um constituinte de culturas de arranque, o elevado grau de viabilidade dos probióticos na saúde humana está relacionado com a minimização da morte celular e as propriedades físicas das microcápsulas obtidas durante o processo de secagem por atomização. As principais dizem respeito à umidade, atividade de água e higroscopicidade. Segundo Tonon et al., (2009) são essenciais para a estabilidade das microcápsulas no armazenamento, e para a solubilidade na reconstituição dos pós.

Tabela 10 - Caracterização das microcápsulas quanto à sua umidade, atividade de água e higroscopicidade.

Ensaio	x_1 (X ₁ %)	x_2 (X ₂ %)	Umidade (g 100g ⁻¹)	Atividade de água	Higroscopicidade (g água 100g ⁻¹ amostra)
1	-1 (2,2)	-1 (0,6)	4,93 ± 0,06 ^{cd}	0,27 ± 0,01 ^g	23,86 ± 1,73 ^b
2	+1 (7,8)	-1 (0,6)	2,89 ± 0,07 ^g	0,31 ± 0,00 ^{ef}	7,64 ± 0,78 ^e
3	-1 (2,2)	+1 (1,4)	5,89 ± 0,13 ^b	0,32 ± 0,01 ^e	18,16 ± 0,00 ^c
4	+1 (7,8)	+1 (1,4)	2,86 ± 0,14 ^g	0,29 ± 0,00 ^f	9,28 ± 0,22 ^e
5	-1,41 (1,0)	0 (1,0)	4,93 ± 0,06 ^a	0,25 ± 0,01 ^g	32,65 ± 0,19 ^a
6	+1,41 (9,0)	0 (1,0)	3,51 ± 0,10 ^e	0,36 ± 0,01 ^c	8,11 ± 0,19 ^e
7	0 (5,0)	-1,41 (0,4)	4,10 ± 0,16 ^f	0,34 ± 0,00 ^c	12,56 ± 0,03 ^d
8	0 (5,0)	+1,41 (1,6)	4,46 ± 0,11 ^{df}	0,39 ± 0,01 ^b	12,94 ± 0,28 ^d
9	0 (5,0)	0 (1,0)	4,97 ± 0,15 ^c	0,41 ± 0,01 ^{ab}	9,00 ± 0,04 ^e
10	0 (5,0)	0 (1,0)	5,01 ± 0,08 ^c	0,41 ± 0,00 ^a	9,30 ± 0,20 ^e
11	0 (5,0)	0 (1,0)	5,00 ± 0,10 ^c	0,41 ± 0,00 ^a	8,99 ± 0,29 ^e

Nota: Médias ± erro padrão seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferiram significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade; x_1 , x_2 : valores codificados para as proporções de mistura das variáveis Acrycoat[®] S100 e *L. plantarum* BG112, respetivamente; (X₁ %) e (X₂ %): valores reais da concentração (m/v) das respetivas proporções adicionadas na mistura da suspensão.

Na maioria dos casos relatados na literatura, a sobrevivência de culturas probióticas secas por atomização à temperatura ambiente ou temperaturas mais elevadas relaciona-se com a estabilidade limitada destas durante o armazenamento. Normalmente, os probióticos são secos a altas temperaturas no processo de atomização, frequentemente acima de 100°C e 60°C, na entrada e saída de ar

quente, respectivamente, sendo a causa mais provável da baixa sobrevivência, assim como as rápidas taxas de secagem que produzem igual efeito de insatisfação (LI et al., 2006). Tem sido demonstrada que variam entre as estirpes de probióticos *Lactobacillus* (GARDINER et al., 2000). Para Chávez e Ledebøer (2007) este parece ser o desafio mais difícil a ser superado antes de aplicar os probióticos secos em alimentos industrializados. Os autores Ananta, Volkert e Knorr (2005) mencionaram que quer para utilização como um alimento complementar ou como um constituinte de culturas de arranque, o elevado grau de viabilidade dos probióticos na saúde humana está relacionado com a minimização da morte celular e as propriedades físicas das microcápsulas obtidas durante o processo de secagem por atomização. As principais dizem respeito à umidade, atividade de água e higroscopicidade. Segundo Tonon et al., (2009) são essenciais para a estabilidade das microcápsulas no armazenamento, e para a solubilidade na reconstituição dos pós.

Neste trabalho o valor de temperatura de entrada de ar na secagem foi escolhido e fixado para utilização na atomização de todos os ensaios com base em testes preliminares e em dados obtidos da literatura. Foi possível observar que quando se empregavam temperaturas de processo muito altas (acima de 100 °C) resultava em degradação dos compostos de interesse que são termossensíveis. Por outro lado, a temperaturas muito baixas (abaixo de 70 °C) o teor de umidade dos pós era consideravelmente alto pelo que se tornava difícil obter a coleta dos mesmos, uma vez que a higroscopicidade aumentava proporcionalmente, prejudicando a fluidez dentro do atomizador. Por conseguinte, essas características ao aumentarem a aderência às paredes do atomizador, grande parte do pó era retido na câmara de secagem comprometendo assim a qualidade e quantidade deste obtido na coleta. As características dos ensaios podem ser observadas na Tabela 10.

Para a propriedade física umidade, os valores obtidos variaram de 2,86% no ensaio 4 a 5,89% no ensaio 3 estando de acordo com os trabalhos como de Cai e Corke (2000) os quais encontraram valores de umidade entre 1,95% e 6,80%, empregando 150 °C na temperatura de entrada de ar, para o estudo de pigmentos de betacianina de *Amaranthus* com maltodextrina, verificando que com o aumento desta os valores da umidade do pó caíam; no de Wang, Yu e Chou (2004) onde o pó obtido pela secagem de extrato aquoso de soja contendo probióticos apresentou umidade entre 4,2% e 10,6%, aumentando estes valores à medida que a

temperatura aplicada diminuía; no estudo de Chávez e Ledebøer (2007) no qual o teor de umidade foi compreendido entre 3,8% e 6,0% em microcápsulas produzidas com proteína isolada de soja associada a carboidratos, como a maltodextrina (temperatura de secagem de 80 °C); no mesmo ano (2007), Ersus e Yurdagel obtiveram valores de umidade entre 2,74% e 3,42% ao encapsular antocianinas em matrizes de maltodextrinas, empregando temperaturas de secagem de 160 °C e 200 °C, respectivamente; e Lokuwan (2007) encontrou valores de umidade entre 2,0% e 6,0% ao encapsular β -caroteno com amido de mandioca; Behboudi-Jobbehdar et al. (2013) obtiveram teores de umidade de 1,7% a 5,4% em microcápsulas produzidas a partir de maltodextrina e proteína de leite concentrada (120 °C – 160 °C na temperatura); Já para Tosoni e Rodrigues (2013) o teor de umidade das amostras de própolis microencapsulada variou de no mínimo 3,54% até no máximo 7,51% onde as condições da secagem foram iguais para todos os ensaios, sendo a umidade das microcápsulas de própolis influenciada apenas pela característica hidrofílica/hidrofóbica do material de parede.

Contudo, o teor de umidade nos pós deve ser abaixo de 5% para a estabilidade de armazenamento segundo os autores Ananta et al. (2004) e Chávez; Ledebøer (2007) verificando-se que os pós obtidos estão de acordo com este parâmetro para assegurar a estabilidade das microcápsulas à exceção do ensaio 3.

De acordo com Koc et al. (2010) e Kumar e Mishra (2004) a atividade de água deve ter valores situados entre 0,11-0,23 para maioria das cepas de *Lactobacillus*, o que não se verifica em nenhum dos ensaios (Tabela 10). Teixeira et al. (1995) na secagem de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. e *Bulgaricus* com temperatura de entrada de ar de 200 °C e saída de 70 °C, em todas as experiências, a sobrevivência às taxas de atividade de água utilizadas foram mais elevadas à temperatura mais baixa de armazenamento (entre 4 e 20°C) as quais encontraram-se na faixa de 0,23; Para Chávez e Ledebøer (2007) os valores de atividade de água entre 0,11 e 0,23 finais preveniram a morte celular durante armazenamento, e os valores mais elevados estavam relacionados com acelerada mortalidade de *L. delbrueckii* estudado; Kha et al. (2010) obtiveram valores de 0,38 a 0,54 para o pó do suco da fruta Gac (*Momordica cochinchinensis*) produzidos com diferentes concentrações de maltodextrina; Silva et al. (2011), ao secar extrato de própolis por atomização sem auxílio de material de parede obteve valor de atividade de água de 0,43. Este valor foi superior ao determinado por Da Silva et al. (2013) (0,25 a 0,39), que estudou a

importância do material de parede na diminuição da atividade água, enfatizando-a na manutenção da estabilidade microbiológica e físico-química do produto; Behboudi-Jobbehdar et al. (2013) também obteve o mesmo valor de 0,23 para microcápsulas produzidas a partir de maltodextrina e proteína de leite concentrada; os trabalhos de Tonon et al. (2009) indicam que os valores de atividade de água devem estar abaixo de 0,3 após a secagem, desta forma é garantida a estabilidade dos pós, visto que uma quantidade menor de água livre estará disponível para a flora bacteriana contaminante e para reações bioquímicas. Para a atividade de água das microcápsulas, obteve-se neste trabalho variações entre 0,25 ensaio 5 e 0,41 ensaios 9, 10 e 11 (Tabela 10). Com isto as condições empregadas não foram adequadas para garantir que a atividade de água estivesse dentro da faixa recomendada, verificando-se apenas em três desses ensaios um bom resultado. Resultados similares foram obtidos por Fritzen-Freire et al. (2012) para microcápsulas de *bifidum* bactéria em leite desnatado.

Em relação à propriedade higroscopicidade, uma vez que esta mede a capacidade de adsorção de água das partículas, há autores que relacionam nos seus estudos a redução da higroscopicidade com o aumento da concentração de agentes carreadores nos pós aplicados a alimentos. Tonon et al. (2008) observaram resultado semelhante a redução da higroscopicidade com o aumento das concentrações de maltodextrina em açaí em pó produzido por atomização; Cai e Corke (2000) concluíram o mesmo aplicando a secagem de pigmentos de betacianina em maltodextrina.

Neste trabalho, o valor mais baixo foi de 7,64 g de água absorvida por 100 g do pó para ensaio 2 e o mais alto de 32,65 g de água absorvida por 100 g do pó para ensaio 5 (Tabela 10). Observa-se que no ensaio 3 e no ensaio 5 quando a quantidade de CAM (Acrycoat[®] S100) está muito próxima da quantidade de *L. plantarum* BG112, este material torna-se muito higroscópico, ou seja, quanto menor a quantidade de encapsulante mais higroscópica a microcápsula. Outra explicação poderá ser obtida se avaliarmos que a menor higroscopicidade das microcápsulas obtidas estar relacionada com a menor hidrofobicidade do CAM que possui uma cadeia hidrofóbica. Este é um copolímero aniônico baseado em ácido metacrílico e metil metacrilato. Esta característica está próxima de bio polímeros naturais como exemplo a maltodextrina comum e acetilada que apresenta os seus materiais amiláceos de baixo valor de dextrose comportando-se mais próximo de amidos do

que produtos altamente hidrolisados que naturalmente são mais higroscópicos. O referido vai de encontro ao estudo feito por Tosoni e Rodrigues (2013) o qual mostra que a higroscopicidade das amostras de própolis microencapsulada variou de 10,45 a 20,79 g de água absorvida por 100 g do pó. Já em trabalhos como Silva et al. (2013) obtiveram valores de 27,4-29,3 e 13,8-15,8, respetivamente, ficando estes valores distantes aos obtidos no estudo anterior.

Além disso, as diferenças na composição dos componentes em causa, influencia a higroscopicidade visto que está relacionada também com a presença de compostos amorfos, como açúcares. Os açúcares, presentes nas frutas como a sacarose, a glicose e a frutose, ou os presentes no meio em que cultura bacteriana cresceu (caldo MRS), são responsáveis por fortes interações com a molécula de água em razão dos terminais polares presentes nessas moléculas (JAYA; DAS, 2004). No caso do *L. plantarum* o meio (caldo MRS) em que se encontrava é muito higroscópico onde a dextrose é a fonte de hidratos de carbono e energia fermentável. Moreira (2007), ao caracterizar extrato microencapsulado de resíduo agroindustrial de acerola, obteve valores para higroscopicidade de 34,72 g e 56,44 g de água absorvida por 100 g de pó.

Também as diferenças de higroscopicidade das amostras podem ser atribuídas ao tamanho das partículas produzidas com o agente de encapsulação. Como relatado por Tonon et al. (2009), quanto maior for o tamanho de partícula, menor a área de superfície exposta e, por conseguinte, mais baixa é a adsorção de água a partir do ar ambiente. Estes autores relataram também o aumento da higroscopicidade em agentes veiculares com massa molar mais baixa e, por conseguinte, com cadeias curtas como é o caso do CAM.

Desta forma, o conteúdo em água é um importante indicador de segurança, estabilidade e qualidade de produtos secos como pós liofilizados. A umidade torna-se um fator crítico que influencia nas propriedades farmacotécnicas do produto como no grau de compressibilidade, a tendência de aglomeração das partículas, além de sua estabilidade durante o armazenamento (SOUZA; OLIVEIRA, 2012; MENG et al., 2008; SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007; WANG; YU; CHOU, 2004) onde Chávez e Ledebøer (2007) lança um valor de 5% desta como garantia. Santivarangkna et al. (2008) defende também, que para manter a viabilidade e sobrevivência das partículas probióticas, deve ser mantida a mais baixa possível. A higroscopicidade não afeta apenas o Rendimento do processo, mas também

compromete a estabilidade microbiológica do produto final (SANTOS, 2013). A atividade de água está relacionada a outros fatores como: a temperatura, a exposição à luz e ao oxigênio, e estabilidade ao tempo de armazenamento de alimentos. Em geral, valores acima de 0,6 favorecem diversas reações indesejáveis como oxidação, reação de Maillard, ação de enzimas e, conseqüentemente, menor vida útil dos produtos (FENNEMA, 2010). Em contra-partida, o excesso de secagem pode diminuir a viabilidade e a estabilidade dos micro-organismos (DE VALDEZ et al., 1985a). Mortalidade de bactérias começa a ocorrer durante o processo de secagem e continua durante o armazenamento. É um resultado combinado do estresse e fatores a que os probióticos são submetidos, não dependendo apenas da seleção dos melhores sobreviventes após a secagem por esta técnica (CORCORAN et al. 2004); LI et al. (2011) relata que o ótimo teor de umidade residual varia com a composição do fluido no qual os micro-organismos são secos, com a atmosfera de armazenamento, e com as espécies utilizadas. Já Behboudi-Jobbehdar et al. (2013) indicam que é a temperatura de entrada do ar de secagem e a vazão de alimentação os quais apresentam efeito significativo no teor de água das microcápsulas. O aumento nos valores do primeiro se aliados à redução do segundo, resultam em pós com maior atividade de água e umidade. Assim, nem toda água presente no material está disponível para crescimento microbiano pois dependerá muito das condições do meio, e reações químicas ou enzimáticas (BALDIM; OLIVEIRA; SOUZA, 2015).

5.2.4 Análise de Comportamento Térmico

5.2.4.1 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Análise Termogravimétrica (TGA)

A curva de DSC obtida para a amostra de *L. plantarum* BG112 não encapsulado (Figura 14) apresenta um pico endotérmico a temperatura de 127 °C, que pode estar relacionado a ebulição da água presente na amostra de micro-organismo e aumento da mobilidade molecular. Para o CAM (Acrycoat® S100) observa-se um pico discreto a temperatura de 220 °C, sugerindo sua temperatura de fusão cristalina (T_m). Sharma et al. (2011) reportaram T_m de 216,2 e 188,5 °C,

respectivamente, para amostras de Eudragit[®] L100 e S100, polímeros similares ao CAM e utilizados na encapsulação de papaína. T_m de 180 °C foi reportada por Silva-Buzanello et al. (2015) para Eudragit[®] S100 utilizado na nanoencapsulação de curcumina.

Não foram observados eventos térmicos nos termogramas das amostras de *L. plantarum* encapsulado, MP 10 e 5 (Figura 14). Picos de transição vítrea e de fusão cristalina não foram identificados demonstrando a natureza amorfa das microcápsulas.

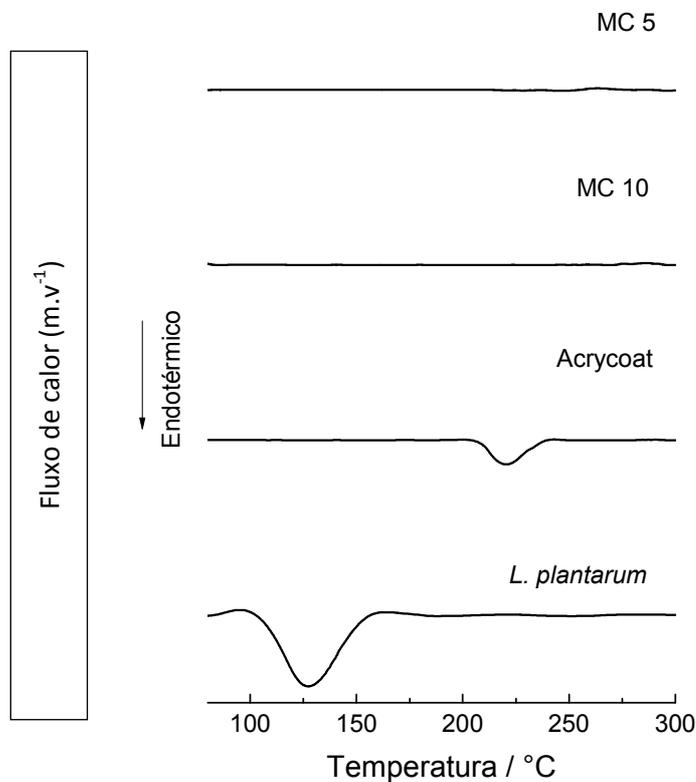


Figura 14 – Curvas de DSC correspondentes as amostras de *L. plantarum* BG112 livre e encapsulado (MC 10 e MC 5) e Acrycoat[®] S100.

As curvas termogravimétricas (TGA) apresentadas na Figura 15 permitem que se observe o comportamento da perda de massa das amostras em função do aumento da temperatura. As curvas derivadas correspondentes às curvas TGA também foram determinadas objetivando a melhor compreensão dos eventos térmicos. Para o *L. plantarum* BG112 livre observa-se perda de 10% de massa já ao

atingir 130 °C. Este comportamento é esperado em virtude da presença de umidade da amostra. Além disso, a perda de massa do micro-organismo ocorre gradativamente, alcançando cerca de 25% à 190 °C; 45% à 285 °C e 70% à 478 °C, caracterizando a degradação dos componentes da amostra sendo a intensidade das mesmas visualizadas pela curva derivada. Já para o Acrycoat[®] S100 a perda de 10% de massa ocorreu apenas a 345 °C, observando sua degradação a temperatura de aproximadamente 428 °C. Nas amostras do micro-organismo encapsulado observa-se para MC 10 um comportamento similar ao apresentado pelo polímero puro, contudo, um pico largo foi obtido na curva derivada entre as temperaturas de 335 e 365 °C correspondente a perda de massa acentuada, indicando o rompimento da microcápsula com degradação do encapsulante e encapsulado. Já para MC 5 uma perda de massa de 20% já é observada a 278 °C indicando a presença do micro-organismo na parte externa da microcápsula.

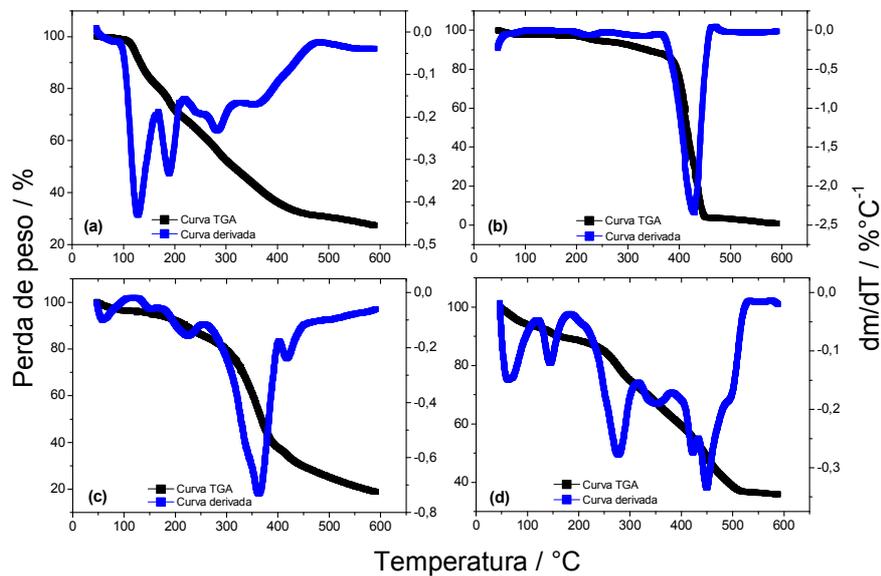


Figura 15 - Curvas TGA (preto) e curvas derivadas correspondentes (azul) para as amostras de *L. plantarum* livre (a), Acrycoat[®] S100 (b), *L. plantarum* encapsulado MC 10 (c) e MC 5 (d).

Dois eventos térmicos podem ser observados mediante a curva TGA derivada para o *L. plantarum* livre (Figura 15a), um primeiro a temperatura de 128 °C e um segundo a 188 °C. Estes mesmos eventos podem ser identificados na curva para

MC 10 contudo, houve deslocamento da temperatura para 152 °C e 222 °C, respectivamente. O mesmo comportamento não foi observado para MC 5, uma vez que o primeiro evento térmico característico do microrganismo ocorre a 145 °C e na sequência uma série de outros eventos são observados caracterizando a presença de microrganismo na parte externa da microcápsula e degradação dos constituintes.

Estes resultados confirmam a maior eficiência de encapsulação nas condições experimentais das microcápsulas do ensaio 10 em comparação às do ensaio 5.

5.2.4.2 Análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – (FTIR-UATR)

Os espectros de infravermelho do encapsulante copolímero do ácido metacrílico (Acrycoat[®] S100) e das células livres e encapsuladas de *L. plantarum* BG112 correspondentes as microcápsulas (MC) de maior e menor Eficiência de encapsulação — ensaios 10 e 5, respectivamente — estão representadas na Figura 16.

Bandas de absorção em 1725 e 1150 cm⁻¹ foram observadas no espectro FTIR-UATR na amostra de Acrycoat[®] S100 sendo estas, respectivamente, características das vibrações C=O dos grupos carbonila esterificados e das vibrações éster (C-O) (MEHTA et al. 2013). Estas duas bandas são características para o material de parede e também foram identificadas nos espectros MC 10 e MC 5, sugerindo a presença do polímero encapsulante na região externa da micropartícula. Contudo, apesar de se ter observado um efeito hipocrômico em relação ao material de parede puro, a intensidade das bandas foi superior na MC 10, em relação à MC 5. No espectro FTIR-UATR das células viáveis de *L. plantarum* observa-se uma banda de absorção a 1580 cm⁻¹, correspondente à faixa da banda amida II. As mesmas, também foram identificadas nas amostras do microrganismo encapsulado, contudo, mais efeito hipocrômico foi observado na MC 10 sugerindo maior efeito protetor do polímero nas condições deste ensaio. Neste caso, a quantidade de polímero foi suficiente para aprisionar o micro-organismo, diferente do observado para o MC 5 onde registou-se banda mais intensa, sugerindo a presença do micro-organismo na parte externa da microcápsula. Estes resultados corroboram com o fato de que a bactéria foi encapsulada com Acrycoat[®] S100 e com os

resultados de eficiência de encapsulação, tendo um processo mais eficiente no ensaio 10 (86,8%) do que no ensaio 5 (6,1%).

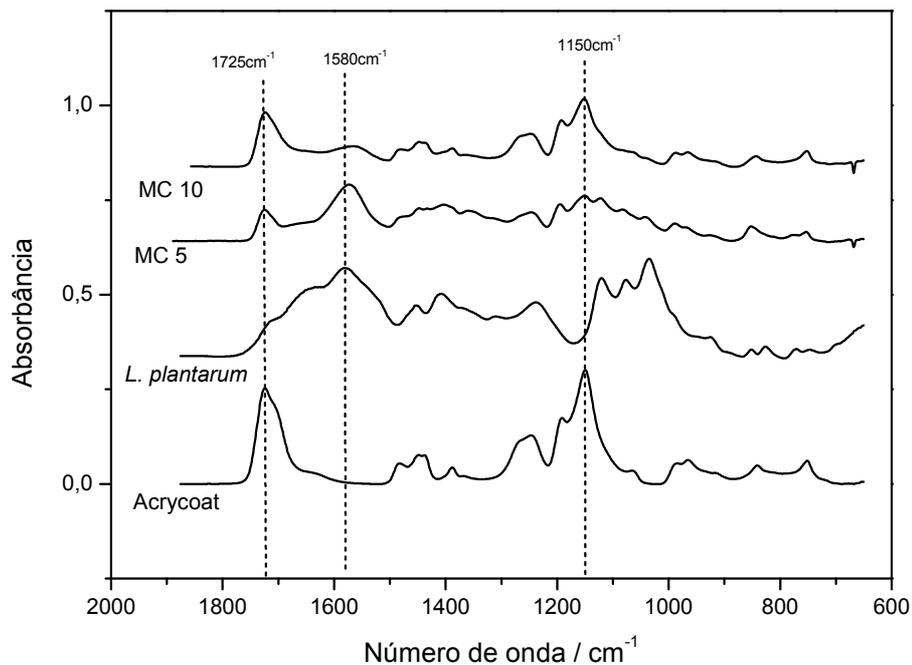


Figura 16 - Espectros de infravermelho (FTIR-UATR) das amostras de Acrycoat® S100 e das células livres e encapsuladas de *L. plantarum* correspondentes às microcápsulas dos ensaios 10 e 5.

5.2.4.3 Análise para ponto ótimo

O espectro FTIR-UATR (Figura 17) correspondente ao ensaio de *L. plantarum* BG112 encapsulado ótimo apresentou características similares as já reportadas para as MC 10, onde bandas de absorção características do polímero encapsulante (1725 cm⁻¹ e 1145 cm⁻¹) foram observadas em maior intensidade e a banda característica para o microrganismo em 1580 cm⁻¹ em menor intensidade, confirmando a Eficiência de encapsulação obtida.

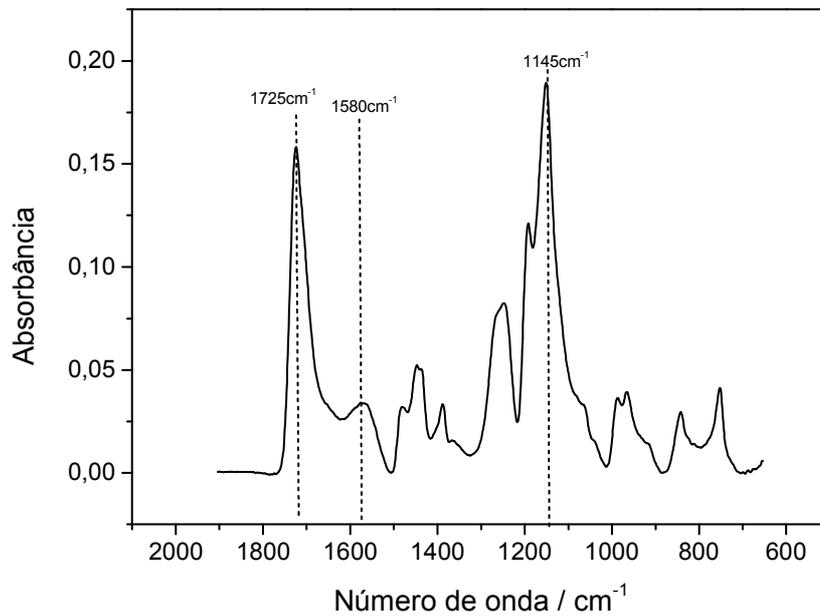


Figura 17 - Espectros de infravermelho (FTIR-UATR) da amostra de *L. plantarum* encapsulado correspondentes às microcápsulas do ensaio ótimo.

Com o termograma (Figura 18a) obtido para MC correspondente ao ensaio ótimo também foi possível identificar a estrutura amorfa das microcápsulas obtidas, assim como observado para MC 5 e MC 10, não havendo eventos de transição vítrea e nem mesmo de fusão cristalina. Nas análises termogravimétricas (TGA) as curvas obtidas (Figura 18b) foram similares as apresentadas para MC 10, havendo da mesma forma um deslocamento para os dois eventos térmicos iniciais característicos para o micro-organismo, sendo nas microcápsulas apresentados em 152 °C e em 222 °C, respectivamente, o que confirma a Eficiência de encapsulação do processo.

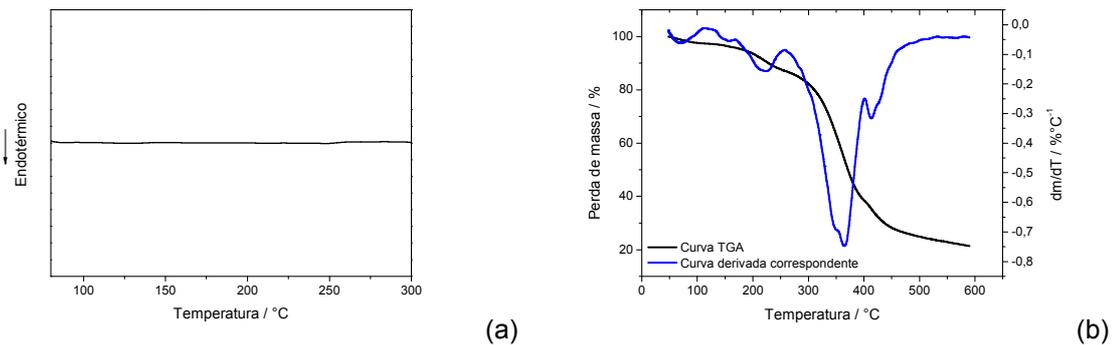


Figura 18 – Curva DSC (a) e TGA (preto) e curvas derivadas correspondentes (azul) (b) da amostra de *L. plantarum* encapsulado correspondente ao ensaio ótimo.

5.3 APLICAÇÃO DO *L. plantarum* BG112 ENCAPSULADO NA PRODUÇÃO DE SALAME TIPO MILANO

5.3.1 Determinação das Curvas de pH e Perdas de Peso Durante a Maturação

Os salames foram maturados por 30 dias (KRUMMENEUR, 2015), tempo suficiente para que o processo de fermentação microbiana viabilizasse a obtenção dos nutrientes, atributos sensoriais típicos desses produtos e alto poder de conservação contra micro-organismos deteriorantes. Esse tempo foi superior ao reportado por Campagnol et al. (2007) ao elaborarem de salames utilizando como cultura *starter Lactobacillus plantarum* fermentado em meio de plasma de suíno com apenas 21 dias de maturação, Degenhardt e San'tanna (2007) ao desenvolverem salames tipo Italiano de modo avaliar a sobrevivência de *Listeria monocytogenes* apresentando um tempo de maturação de 28 dias, e Macedo et al. (2008) ao produzirem salame tipo Italiano fermentado por cultura de *Lactobacillus* probióticos maturado durante 25 dias.

A redução do pH em salames é ocasionada pela ação de bactérias ácido-láticas sobre os açúcares com consequente produção de ácido lático resultante da metabolização dos carboidratos (LÜCKE, 2000). As curvas de pH representadas na Figura 19 indicam que o pH variou de 5,5-5,3 desde o início do processo de maturação até ao final deste (30 dias), e dentro dessa faixa as oscilações entre os valores mantiveram-se muito próximas entre si para ambos os salames.

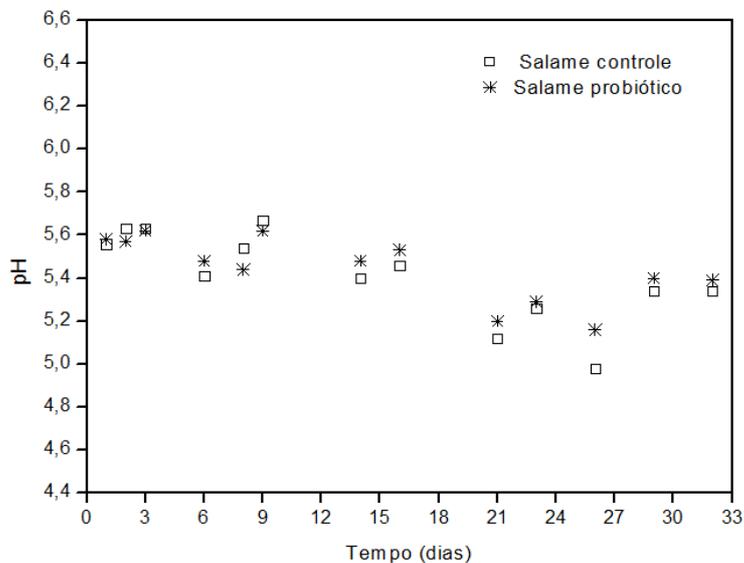


Figura 19 - Curva de decréscimo do pH dos salames.

Porém, a partir do vigésimo sétimo dia de fermentação, para ambos os salames, ocorreu um aumento nos valores do pH. Essa elevação no valor do pH durante a etapa de maturação está de acordo com o encontrado em vários outros salames fermentados (GRECO et al., 2005; GARDINI et al., 2002; SAMELIS et al., 1994). A razão apresenta-se pelo provável aumento da atividade proteolítica, com a formação de peptídeos, aminoácidos e compostos nitrogenados não protéicos (DURÁ; FLORES; TOLDRÁ, 2004; FRANCO et al., 2002; SANZ et al., 1997).

De modo geral, o resultado foi similar ao encontrado no trabalho de autores como Sameshima et al. (1998) com valores de 5,0-5,2 em salames adicionados de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei* para o mesmo tempo de maturação. Estas variações podem ter sido decorrentes da matéria-prima e formulações utilizadas.

Em alguns países, o valor do pH dos salames é um dos critérios utilizados para o controle de sua qualidade (BOZKURT; ERKMEN, 2002), entretanto, no Brasil, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salame (BRASIL, 2000) não utiliza o valor do pH como parâmetro de controle.

Além da variação do pH, a perda de peso (Tabela 11) também é um fator decorrente da desidratação dos salames, resultando numa consequência natural do seu processo de maturação.

Tabela 11 - Perda de peso das amostras de salame.

Amostras	Perda de peso* (%)
SLPE	38,95 ^a ±1,37
SC	37,73 ^a ±0,66

Nota: * Médias ± desvio padrão seguidos de letras iguais na mesma coluna indicam que as amostras não diferem estaticamente ($p > 0,05$, teste t); SC: Salame Controle; SLPE: Salame *L. plantarum* Encapsulado

Os resultados indicam que as amostras não diferiram estaticamente entre si ($p > 0,05$). CAMPOS (2002) verificou perda de peso ao final do processamento em salame tipo Italiano entre 37,9% e 40,7%. MACEDO (2005) encontrou valores de perda de peso entre 30,46% e 38,18% em salames elaborados com cultura probiótica. Dalla Santa (2008) observou diferentes perdas de peso dos salames em que 37,60% foi no controle, 40,41% para *L. plantarum* 503 e 37,55% *L. plantarum* 341; e com os de Krummenauer (2015) ao conseguirem percentuais de perda de peso próximas de 41% em amostras de salame tipo Milano com substituição parcial do toucinho por queijo mussarela. Dessa forma, os resultados encontrados neste trabalho são semelhantes aos citados anteriormente.

5.3.2 Determinação da Composição Centesimal e das Propriedades Físico-Químicas

As duas amostras de salame elaboradas apresentaram-se dentro dos padrões exigidos pela Legislação Brasileira, em todos os parâmetros, considerando a Instrução Normativa n° 22 de 31/07/2000 – MAPA – Regulamento Técnico de Salame tipo Milano (BRASIL, 2000) (Tabela 12).

Tabela 12 - Resultados da composição centesimal e actividade de água das amostras de Salame Controle e Salame com *L. plantarum* BG112 encapsulado.

Determinações	Legislação*	SC**	SLPE***
Umidade (g.100 g ⁻¹)	Máx. 35	30,9 ^a ± 0,7	30,3 ^a ± 0,5
Proteína (g.100 g ⁻¹)	Mín. 23	31,3 ^a ± 0,5	30,6 ^a ± 0,6
Lipídios (g.100 g ⁻¹)	Máx. 35	29,5 ^a ± 1,7	28,9 ^a ± 0,4
Cinzas (g.100 g ⁻¹)	-	6,9 ^a ± 0,2	6,5 ^a ± 0,1
Atividade de água	Máx. 0,90	0,86 ^a ± 0,00	0,84 ^a ± 0,00

Nota: * Instrução Normativa nº 22 de 31/07/2000 – MAPA – Regulamento Técnico de Salame tipo Milano; **SC: Salame Controle; ***SLPE: Salame *L. plantarum* Encapsulado; Médias ± desvio padrão com letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam que não houve diferença entre os tratamentos (p≥0,05, teste t).

A redução da umidade e conseqüentemente da atividade de água durante a etapa de maturação permite o desenvolvimento da textura e do flavor, característicos deste tipo de produtos (FERNÁNDEZ et al., 2000). Neste estudo, apresentaram valores de 30,9 g.100 g⁻¹ no SC e 30 g.100 g⁻¹ no SLPE, o que indica que a umidade durante a maturação diminuiu, uma vez que depende de fatores internos e externos, bem como de uma fermentação láctica eficiente e do tempo necessário de cura (COMI et al., 2005; SOYER; ERTAS; ÜZÜMCÜOĞLU, 2005). Macedo (2005) obteve teores de umidade entre 36,55 g.100 g⁻¹ e 42,54 g.100 g⁻¹ para salames elaborados com cultura probiótica.

Sendo a atividade de água um dos fatores mais relevantes para a multiplicação microbiana e desta forma influenciadora para a estabilidade dos alimentos, os valores observados para o salame controle foram ligeiramente mais altos que para o salame com o probiótico inserido (Tabela 12) (p≤0,05), mas em ambos os casos atenderam ao determinado pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salame (BRASIL, 2000). Estes resultados determinam a estabilidade dos mesmos relativamente às alterações microbianas indesejáveis. Desta forma os produtos com tais características não necessitam de armazenamento sob

refrigeração. A vida útil de salames classificados como estáveis é determinada principalmente por deteriorações químicas e físicas, como a rancificação e a descoloração (AMBROSIADIS et al., 2004).

Sendo assim, essa desidratação contribuiu também para o aumento do teor de proteínas e lipídeos (SOYER; ERTAS; ÜZÜMCÜOĞLU, 2005), importantes tanto

pelo aspecto nutricional como por suas propriedades tecnológicas (IBAÑEZ et al., 1997).

Uma vez que a quantidade mínima esperada para o parâmetro proteína era de 23 g.100 g⁻¹, as amostras corresponderam adequadamente (31,3 g.100 g⁻¹ para o SC; 30,6 g.100 g⁻¹ para o SLPE). Em seu trabalho, Macedo (2005) obteve salames com teores de proteínas entre 21,81 g.100 g⁻¹ e 24,78 g.100 g⁻¹ e teores de gordura entre 28,77 g.100 g⁻¹ e 33,17 g.100 g⁻¹, após 28 dias de processamento. Outros estudos relatam a utilização de diferentes quantidades de gordura na produção de salames e o efeito direto sobre as características físicas, a composição química e a aceitação sensorial dos salames (SOYER; ERTAS; ÜZÜMCÜOĞLU, 2005; AMBROSIADIS et al., 2004; NASSU; GONÇALVES; BESERRA, 2002). Quanto ao teor de gordura ambas as amostras atenderam ao especificado na legislação (Tabela 12) não havendo diferença significativa entre as elas (p>0,05). Em relação ao teor de cinzas os valores obtidos (Tabela 12) para ambas as amostras foram similares a valores obtidos por Krummenauer et al. (2015) na análise de amostras comerciais, nas quais observaram valores de 5,9 e 6,4%.

Portanto, no geral as amostras avaliadas apresentaram resultados coerentes e adequados para as determinações efetuados em relação aos valores de umidade, proteína, lipídeos, cinzas e atividade de água.

Considerando os parâmetros de cor e força de cisalhamento observados nos salames maturados, verificou-se ausência de diferenças significativas (p>0,05) entre o salame com cultura probiótica (SLPE) e o de controle (SC) (Tabela 13).

Tabela 13 - Resultados das medidas instrumentais de cor e textura (força de cisalhamento) para as amostras de salame.

Determinações	*SC	**SLPE
L*	45,60 ^a ± 1,48	42,93 ^a ± 3,39
a*	12,09 ^a ± 0,82	10,62 ^a ± 1,43
b*	8,77 ^a ± 0,63	9,75 ^a ± 0,80
Força de cisalhamento (N)	27,8 ^a ± 11,4	29,8 ^a ± 9,5

Nota: Médias ± desvio padrão seguido de letras iguais sobrescritas na mesma linha indicam que não houve diferença significativa entre as amostras (p>0,05, teste t) ; *SC: Salame Controle; **SLPE: Salame *L. plantarum* Encapsulado

O processo de secagem e maturação dos salames está relacionado com a medida L* onde os valores representam a cor atingida pela concentração de sólidos

aumentar pelo efeito da desidratação, ou seja, os salames tendem a escurecer no decorrer do processo de cura (PÉREZ-ALVAREZ et al., 1999). Os valores obtidos foram inferiores aos observados por Cavenaghi (1999) em salames Italianos com valores de 47,6 e 49,6 para a luminosidade (L^*) e superiores aos encontrados por Garcia, Gagleazzi e Sobral (2000) em salame tipo Italiano após 20 dias de processamento. Macedo (2005) obteve valores de luminosidade (L^*) que variaram de 41,98 a 47,76 no final do processamento (28 dias) ao elaborar salames com culturas lácticas probióticas.

Com relação à intensidade de vermelho (a^*) observaram-se valores de 12,09 e 10,62 para SC e SLPE, respectivamente. Este valor a^* também está relacionado ao processo de cura e maturação dos salames. O principal pigmento cárneo, mioglobina, interage com o óxido nítrico formando um composto denominado de nitrosomioglobina, representativo de carnes curadas e susceptível de sofrer oxidação (ZANARDI et al., 2002). Resultados obtidos foram inferiores aos do estudo de Dalla Santa (2008) para os valores 18,85 e 20,74 no índice a^* (cor vermelha) e superiores ao índice de cor amarela, b^* , com valores entre 6,89 e 7,88. Campagnol (2007) conseguiu valores entre 11,00 a 24,04 em a^* e 6,89 a 12,95 para b^* corroborando os resultados uma vez que se encontram dentro destas faixas.

O parâmetro b^* (intensidade de amarelo) representa o consumo de oxigênio realizado pelos micro-organismos das culturas inseridas, tanto a cultura *starter* como a cultura probiótica durante a sua fase de crescimento exponencial (PÉREZ-ALVAREZ et al., 1999). De acordo com os resultados é possível afirmar que o *L. plantarum* não interferiu nas medidas instrumentais do salame.

5.3.3 Determinações Microbiológicas

Os resultados das análises microbiológicas das amostras de salames estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados da qualidade microbiológica dos salames.

Determinações	Legislação*	**SC	***SLPE
<i>Salmonella</i> spp. (em 25 g)	Ausência	Ausência	Ausência
Staphylococcus coagulase positiva (UFC.g ⁻¹)	5x10 ³	<10 ²	<10 ²
Coliformes a 45°C (UFC.g ⁻¹)	10 ³	<10 ¹	<10 ¹
Clostridium sulfito redutor a 46° C (UFC.g ⁻¹)	-	<10 ¹	<10 ¹
Bactérias ácido-láticas totais (UFC.g ⁻¹)	-	1,48x10 ⁵	2,45x10 ⁸
Bactérias aeróbicas mesofílicas (UFC.g ⁻¹)	-	8,57x10 ⁸	4,60x10 ⁸

Nota: * RDC nº 12 de 02/01/01 (BRASIL, 2001); **SC: Salame Controle; ***SLPE: Salame *L. plantarum* Encapsulado; Os resultados para bactérias aeróbicas mesofílicas, bactérias lácticas totais, Clostridium sulfito redutor a 46° C, Coliformes a 45°C e Staphylococcus coagulase positiva são expressos em log unidades formadoras de colônias por grama de amostra (log UFC.g⁻¹).

Sabe-se que a qualidade microbiológica da matéria-prima é um fator fundamental, bem como a capacidade de ação e transformação que a microflora nativa exerce na transformação da matéria-prima em produto final.

Todas as amostras analisadas atenderam aos critérios estabelecidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2001), a citar a pesquisa de *Salmonella* spp., contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, contagem de Coliformes a 45 °C e contagem de *Clostridium* sulfito redutora 46 °C, sendo consideradas aptas para o consumo. O resultado das bactérias aeróbicas mesofílicas apresentou contagem 8 log UFC.g⁻¹ para ambas as amostras. Ambrosiadis et al. (2004) avaliando 67 amostras de salame tradicionais da Grécia, encontraram valores médios para aeróbios mesófilos de 8 log UFC.g⁻¹, com um mínimo de 5 log UFC.g⁻¹ e um máximo próximo a 9 log UFC.g⁻¹, corroborando o resultado obtido. Em estudos de Moretti et al., (2004); Comi et al., (2005) a contagem total durante a maturação traduziu-se em valores entre 7 log UFC.g-1 a 9 log UFC.g-1 no produto final ao caracterizar salames fermentados típicos Italianos. Da mesma forma, Rubio et al. (2014) obteve 8 log UFC.g⁻¹ ao final do tempo de maturação em embutidos fermentados de baixa acidez (designados de fuets) ao utilizar cepas de *Lactobacillus* probióticos.

A concentração de bactérias lácticas presentes no início da fermentação é bastante variável. Vai influenciar a diminuição do pH dependendo do rápido desenvolvimento das mesmas com a metabolização de carboidrato que leva à formação de ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico, e direta descida do pH (COMI et al., 2005). Neste estudo constatou-se que o SLPE apresentou contagem 8 log UFC.g⁻¹, sendo 3 log superior ao SC. Este resultado esta de acordo com o que a ANVISA estipula para quantidade mínima viável por porção para ser considerado probiótico. Autores como Coman et al. (2012) demonstraram que a combinação de

duas cepas de probióticos teve uma ação mais benéfica (*L. rhamnosus* IMC 501 e *L. paracasei* IMC 502) em salame italiano e salame suíço capazes de dominar as LAB endógenas durante o processo inteiro, atingindo níveis de 10^8 UFC.g⁻¹ que permaneceram até um máximo prazo de validade indicado pelo produtor.

Já os autores Soyer; Ertas; Üzümcüoglu (2005) defendem que a concentração de BAL é influenciada pela temperatura de maturação e o teor de gordura, sendo que os salames destes produzidos com 10% de gordura tiveram contagens maiores, seguidos daqueles com 20% e 30% de gordura.

Por norma, as quantidades elevadas de BAL contribuem com a segurança e a estabilidade microbiológica dos salames, devido à produção de substâncias denominadas de bacteriocinas, capazes de inibir o crescimento de algumas espécies de bactérias patogênicas e também da flora microbiana deteriorante (DE VUYST; FALONY; LEROY, 2008; TERRA, 2003; DE MARTINS et al., 2002; ROSA et al., 2002; HANSEN, 2002; HOLZAPFEL, 2002). Uma solução para aumentar a concentração de BAL poderá ser possível pela elaboração de uma nova formulação de salames em que haja aplicação de mais de uma cepa de *Lactobacillus*, ou melhorar as condições de maturação.

5.3.4 Análise Sensorial

A análise sensorial das amostras de salame com diferentes formulações (Tabela 15) foi realizada após uma semana do término do processo de maturação e após obtenção dos resultados da análise microbiológica, verificando que todas as formulações estavam dentro dos padrões estabelecidos.

Realizada por uma equipe montada (141 provadores) para analisar as características sensoriais do produto, a análise mostrou que os avaliadores foram predominantemente do sexo feminino (55,3%), com idade inferior a 26 anos (80,9%). O perfil de instrução revelou que a grande maioria dos consumidores (87,2%) apresentaram escolaridade ao nível de ensino médio completo e/ou superior incompleto, seguido com 8,5% de superior completo e/ou pós-graduados incompleto e 4,3% de pós-graduados completo. Em relação à situação profissional, a maioria (67,4%) dos consumidores foram os universitários e os demais (32,6%) afirmaram desempenhar outras atividades profissionais. A maioria dos participantes é

consumidor de produtos cárneos (99,3%) equilibrando os diferentes tipos de produtos consumidos (salame, presunto e apresuntado, hambúrguer, empanado, mortadela e linguiça). A frequência de consumo destacou-se com 58,9% para o parâmetro “Ocasionalmente”, 22,0% uma vez por semana, 11,3% de três vezes por semana e 7,8% todos os dias.

Conforme observado na Tabela 15 os valores médios obtidos na avaliação sensorial relativo ao perfil de características das amostras mostraram não diferir estatisticamente entre si ($p > 0,05$) quando avaliadas pelo teste afetivo da escala hedônica de 10 pontos para os atributos cor, aroma, sabor, textura, e intenção de compra, revelando que não houve uma amostra mais aceita em relação à outra.

Os resultados da sensorial sobressaem aos encontrados no trabalho de Dalla Santa, (2008) ao avaliar a qualidade de salames artesanais e selecionar culturas *starter* (*L. plantarum* 503, *L. plantarum* 341 e *L. plantarum* 341 + pólen) para a produção de salame tipo Italiano.

Tabela 15 - Resultados da análise sensorial dos salames.

Parâmetros sensoriais	SC	SLPE
	<i>Teste de preferência</i>	
Soma de julgamentos	59 ^a	82 ^a
	<i>Escala hedônica</i>	
Cor	7,0 ^a ± 2,0	6,8 ^a ± 1,7
Aroma	7,0 ^a ± 2,0	7,2 ^a ± 1,8
Sabor	7,6 ^a ± 1,9	7,6 ^a ± 1,7
Textura	7,7 ^a ± 1,7	7,6 ^a ± 1,7
Aceitação global	7,7 ^a ± 1,6	7,6 ^a ± 1,5
Intenção de compra	7,4 ^a ± 1,9	7,4 ^a ± 1,9
	<i>Índice de aceitabilidade</i>	
Cor	70%	68%
Aroma	70%	72%
Sabor	76%	76%
Textura	77%	76%
Aceitação global	77%	76%
Intenção de compra	74%	74%

Nota: Teste de preferência: somas com letras diferentes sobrescritas na mesma linha diferiram entre si ($n = 141$; $p < 0,05$); Escala hedônica: médias dos valores sensoriais ± desvio padrão ($n = 141$); médias com letras iguais sobrescritas na mesma linha não diferiram entre si ($p > 0,05$).

Os índices de aceitabilidade (IA) calculados para as amostras em análise em relação aos quatro atributos analisados pelos julgadores (Tabela 15), mostraram boa aceitação. Considerado como limite mínimo de 70% para um produto ser sensorialmente aceitável (TEIXEIRA; MEINERT; BARBETTA, 1987) os resultados

correspondem às expectativas, concluindo-se que a substituição da cultura *starter* comercial por *L.plantarum* BG112 não influenciou os atributos sensoriais avaliados.

Em salames elaborados com diferentes cepas de *Lactobacillus* (*plantarum*, *rhamnosus*, *sakei*) e uma de *P. pentosaceus* dos autores Erkkilä et al., (2001) não foram observadas diferenças significativas no perfil do flavor entre os salames nos diferentes tratamentos. A cor é a característica sensorial mais apreciada e mais influenciadora sobre o julgador como primeiro parâmetro a ser avaliado. Estes valores podem estar relacionados com os valores de umidade conseguidos com consequente concentração dos pigmentos responsáveis pela cor vermelha. A umidade também incide sobre a textura devido à desidratação no processo de maturação, a qual neste trabalho não teve influencia. Campagnol et al. (2007) ao elaborarem salames com a inoculação de *L. plantarum* e *S. xylosus* não foram observadas alterações sensoriais perceptíveis na cor, aroma e textura. Porém, o sabor desses salames foi agradavelmente superior aos salames produzidos sem a adição de culturas *starter* ou aqueles produzidos com a adição de *starter* comercial, contendo *Pediococcus pentosaceus* e *S. xylosus*.

No teste pareado-preferência, dos 141 provadores, 82 preferiram a amostra de SLPE, contra 59, que preferiram o SC. Conforme Roessler et al. (1978) são necessários 83 julgamentos mínimos para uma das amostras ser considerada preferida ($p < 0,05$). Portanto, o teste pareado-preferência confirmou não haver preferência entre o salame probiótico e a amostra controle ($p > 0,05$).

Assim, a cepa de *L. plantarum* BG112 isolada e aplicada no salame pode ser utilizada como cultura *starter* na produção de salames com características sensoriais semelhantes aos produzidos com a utilização de culturas *starter* comerciais.

5 CONCLUSÃO

A otimização do processo com Acrycoat[®] S100 seguido de secagem por atomização (*spray drying*) utilizando um planejamento experimental permitiu a obtenção de microcápsulas com alta concentração de células viáveis de *L. plantarum* BG112. Os valores de Rendimento e Eficiência foram adequados, uma vez que as modificações nas proporções das variáveis de processo afetaram significativamente estas respostas. Os dados demonstraram a capacidade do Acrycoat[®] S100 como uma opção interessante de material de suporte para a microencapsulação de probióticos, visto que aumentará as chances de serem liberados no local pretendido.

As microcápsulas apresentaram características semelhantes ao esperado em processo de microencapsulação onde atividade de água, higroscopicidade, umidade e tamanho foram adequadas. As análises do comportamento térmico e de FTIR-UATR indicaram uma possível interação entre o copolímero do ácido metacrílico (encapsulante) e o micro-organismo (material ativo), pela formação de estruturas com propriedades térmicas e características diferentes nos diversos ensaios. As curvas de DSC e TGA sugeriram ainda que as microcápsulas são estáveis às temperaturas de processamento de alimentos.

Foi possível desenvolver uma formulação de salame tipo Milano fermentado com *L. plantarum* estável em relação ao pH, uma vez que não apresentou diferença significativa quando comparado com a formulação controle. Em relação aos demais parâmetros físico-químicos a amostra com *L. plantarum* encapsulado atendeu a legislação vigente.

Não houve desenvolvimento de *Salmonella* spp, e os micro-organismos *Staphylococcus* coagulase positiva, Coliformes a 45 °C e *Clostridium* sulfito redutor a 46 °C mostraram-se com valores abaixo do permitido pela legislação vigente qualificando-se em termos microbiológicos aptos para consumo. A contagem das bactérias ácido-láticas atendeu ao exigido pela legislação brasileira de alimentos, para que um alimento tenha alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde utilizando o *L. plantarum* na sua constituição.

O produto teve boa aceitação sensorial e boa intenção de compra por parte dos provadores, para além das características físico-químicas serem semelhantes aos salames fermentados vendidos no Brasil com categoria de Milano.

REFERÊNCIAS

AGHBASHLO, M.; MOBILI, H.; MADADLOU, A.; DAFIEE, S. Influence of wall material and inlet drying air temperature on the microencapsulation of fish oil by spray drying. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 1561-1569, 2013.

AGRAWAL, R. Probiotics: an emerging food supplement with health benefits. **Food biotechnology**, v.19, n.3, p.227-246, 2005.

AKHGARI, A.; GAREKANI, H. A.; SADEGHI, F.; AZIMAIE, M. Statistical optimization of indomethacin pellets coated with pH-dependent methacrylic polymers for possible colonic drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 305, p.22-30, 2005.

AMBROSIADIS, J.; SOULTOS, N.; ABRAHIM, A.; BLOUKAS, J. G. Physicochemical, microbiological and sensory attributes for the characterization of Greek traditional sausages. **Meat Science**, v. 66, p. 279-287, 2004.

ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science and Technology**. n.18, p.240-251, 2007.

ANANTA, E.; BIRKELAND, S.E.; CORCORAN, B.M.; FITZGERALD, G.; ET AL. Processing effects on the nutritional advancement of probiotics and prebiotics. *Microbial Ecology in Health and Disease*, v.16, p.113–124, 2004.

ANANTA, E.; VOLKERT, M.; KNORR, D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*, v.15, p.399–409, 2005.

ANEKELLA, K.; ORSAT, V. Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 17-24, 2013.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm> Acesso em 06 Jul. 2016.

AOAC. American Organization Of Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**. 18. ed. Arlington: AOAC, 2005.

ARSLAN, S.; ERBAS, M.; TONTUL, I.; TOPUZ, A. Microencapsulation of Probiotic *Saccharomyces Cerevisiae* Var: *Boulardii* with Different Wall Materials by Spray Drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 685–690, 2015.

AURELI, P.; CAPURSO L.; CASTELLAZZI, A.M.; CLERICI, M.; GIOVANNINI, M.; MORELLI, L.; POLI, A.; PREGLIASCO, F.; SALVINI, F.; ZUCCOTTI, G.V. Probiotics and health: An evidence-based review. **Pharmacological Research**, v. 63, p.366–376, 2011.

BACUS, J. Meat fermentation. **Food Technology**, v.38, n.6, p.59-63, Chicago, 1984.

BALDIM, I.; OLIVEIRA, W.P.; SOUZA, C.R.F. *Spray drying* de dispersões lipídicas contendo antioxidantes naturais. **XXXVII ENEMP**, Congresso brasileiro de sistemas particulados, São Carlos, 2015

BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S.; SOUKOULIS, C.; YONEKURA, L.; FISK, I. Optimization of Spray-Drying Process Conditions for the Production of Maximally Viable Microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. **Drying Technology: An International Journal**, v. 31, n.11, p. 1274-1283, mar. 2013.

BENITA, S. Microencapsulation Methods and Industrial Applications. ed.2, New York London, Taylor and Francis Group, v. 158, 2006. Disponível em : <<http://pt.scribd.com/doc/35912143/Micro-Encapsulation-Methods-and-Industrial-Applications-Second-Edition#scribd>>. Acesso em: 9 de Out. 2015.

BERAQUET, N.J. **Embutidos fermentados**: princípios do processamento de embutidos cárneos. Campinas: Centro de Tecnologia de Carnes. p.147-159, 2005.

BERNARDI, D.M; ROMAN, J.A. **Caracterização sensorial de linguiça toscana com baixo teor de sódio e análise do consumo de carne suína e derivados na região oeste do Paraná**. 2011. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos. Curitiba, v. 29, 2011.

BOSNEA, L.; KOURKOUTAS, Y.; ALBANTAKI, N.; TZIA, C.; KOUTINAS, A.A.; & KANELLAKI, M. Functionality of freeze-dried *L. casei* cells immobilized on wheat grains. **LWT- Food Science and Technology**, v. 42, p. 1696–1702, 2009.

BOZKURT, H.; ERKMEN, O. Effects of starter culture and additives on the quality of Turkish style sausage (sucuk). **Meat Science**, v. 61, p. 149-156, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. 2015a. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>>. Acesso ao site em: 16 de out. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº20, de 21 de Julho de 1999. Oficializa os métodos físico-químicos, para controle de produtos cárneos e seus ingredientes - sal e salmoura, em conformidade ao anexo desta instrução normativa, determinando que sejam usados em sistema de laboratório animal do departamento de defesa animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, Secção 1, p.10, 27/07/1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 20 de 21/08/1999. Oficializa os Métodos Analíticos Físico-Químicos, para Controle de Produtos Cárneos e seus Ingredientes - Sal e Salmoura. **Diário Oficial da União**, Brasília, 27/08/1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 22 de 31/07/2000. Anexo V. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Copa, de *Jerked Beef*, de Presunto tipo Parma, de Presunto Cru, de Salame, de Salaminho, de Salame tipo Alemão, de Salame tipo Calabres, de Salame tipo Friolano, de Salame tipo Napolitano, de Salame tipo Hamburgues, de Salame tipo Italiano, de Salame tipo Milano, de Linguiça Colonial e Pepperoni. **Diário Oficial da União**, Brasília, 03/08/2000. Disponível em: <http://www.engetecno.com.br/legislacao/carnes_salame.htm> Acesso em: 26 Ago. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 29/12/2006. Adotar o Regulamento Técnico de Atribuição de Aditivos, e seus Limites das seguintes Categorias de Alimentos 8: Carne e Produtos Cárneos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 04/01/2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diretoria de Agroenergia. Informações obtidas por solicitação, 2015. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arg_editor/PROJECOES_DO_AGRONEGOCIO_2025_WEB.pdf>. Acessado em: 05 Jun. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, 2 de Janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, em anexo. Disponível em: < <http://e->

[legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144&word=.](http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144&word=)> Acessado em: 09 Dez. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 275 de 21/10/2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores / Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23/10/2003.

BRASIL. Ministério da Saúde – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1004 de 11/12/1998. Aprova o Regulamento Técnico Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 – Carne e Produtos Cárneos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22/03/1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio: Brasil 2012/2013 a 2022/2023. **Diário Oficial da União**, Brasília:, p. 1-98, 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arg_editor/PROJECOES_DO_AGRONEGOCIO_2025_WEB.pdf> Acesso em: 04 Jul. 2016.

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

CAI, Y.Z.; CORKE, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. **Journal of Food Science**, v.65, p.1248-1252, 2000.

CAMPAGNOL, P. C. B.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N.; SANTOS, B. A.; FURTADO, S. S. Salame elaborado com *Lactobacillus plantarum* fermentado em meio de cultura de plasma suíno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 883-889, 2007.

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

CANO, C.C. **Análise do processo de desenvolvimento de novos produtos na indústria avícola**. 2008. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Administração e Negócios da Faculdade de Administração, Contabilidade e Economia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008.

CAO, X.; WEN, H.; LI, C.; GU, Z. Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenetic rice proteins. **Journal Cereal Science**, v. 50, p. 184-189, 2009.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A literature Survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, nº4, p. 281-370, 2002.

CAVENAGHI, A. D. **Uso da associação de culturas starter na fabricação do salame tipo italiano**. 1999. 151 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. São Paulo. 1999.

CAYRÉ, M. E., VIGNOLO, G., GARRO, O., Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsion stored at three temperatures. **Food Microbiology**, v.20, p.561-566, 2003.

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.

CHANDI, G.K.; SOGI, D.S. Functional properties of rice bran protein concentrates. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p. 592-597, 2007.

CHANDRAMOULI, V.; KALAISAPATHY, K.; PEIRIS, P.; JONES, M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. **Journal Microbiological Methods**. V. 56, p. 27-35, 2004.

CHANG, Y.X.; YANG, J.J.; PAN, R.L.; CHANG, Q.; LIAO, Y.H. Antihygroscopic effect of leucine on spray-dried herbal extract powders. **Powder Technology**, Lausanne, v. 266, p. 388-395, nov. 2014.

CHATTERJEE, D.; BHATTACHARJEE, P. Comparative evaluation of the antioxidant efficacy of encapsulated and un-encapsulated eugenol-rich clove extracts in soybean oil: Shelf-life and frying stability of soybean oil. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 545-550, 2013.

CHÀVEZ, B.E.; LEDEBOER, A.M. Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying Technology*, v. 25, n. 7-8, p.1193-1201, 2007.

CHEN, H.; ZHANG, Y.; ZHONG, Q. Physical and antimicrobial properties of spray-dried zein Y.; ZHONG, Q. Physical and antimicrobial properties othymol. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 144, p. 93-102, 2015.

CIROLINI, A.; FRIES, L.L.M.;TERRA, N.N.; MILANI, L.I.G.,URNAU, D.; DOS SANTOS, B.A.; CERVO, G.D.;REZER, A.P.S. Fermented italian sausage elaborated with native starter cultures. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.30, Supl.1, p. 171-179, Campinas, maio 2010.

CLAESSON, M.J.; SINDEREN, D.; O'TOOLE, P.W. The genus *Lactobacillus* - a genomic basis for understanding its diversity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 269, n. 1, p. 22-28, 2007.

COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN G.O. Selection of Probiotic Strains for Human Applications. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5-6, p. 487–90, 1998.

COLOMÉ, L.M.; RAFFIN, R.P.; JORNADA, D.S.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Pantoprazole-Loaded Eudragit Blended Microparticles: Preparation, Characterization, in Vitro Gastro-Resistance and in Vivo Anti-Ulcer Evaluation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 17, n. 2, p. 113–118, 2007.
COMAN, M. M., CECCHINI, C., VERDENELLI, M. C., SILVI, S., ORPIANESI, C., & CRESCI, A Functional foods as carriers for SYN BIO®, a probiotic bacteria combination. **International Journal of Food Microbiology**, v.157, p. 346–352.2012.

COMI, G.; URSO, R.; IACUMIN, L; RANTSIOU, K.; CATTANEO, P.; CANTONI,C.; COCOLIN, L. Characterization of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Science*, v. 69, p. 381-392, 2005.

COMMANE, D.; HUGHES, R.; SHORTT, C.; ROWLAND, I. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. **Mutation Research**, v. 591, p. 276–289, 2005.

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

CORCORAN, B.M.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, n. 5, p. 1024–1039, mai. 2004.

CORCORAN, B.M.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.1024–1039, 2004.

D'AIMMO, M. R., MODESTO, M., & BIAVATI, B. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and Bifidobacterium spp. Isolated from dairy and pharmaceutical products. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, n.1, p.35–42, 2007.

DALLA SANTA, Osmar Roberto. **Avaliação da qualidade de salames artesanais e seleção de culturas starter para a produção de salame tipo italiano**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Curitiba: UFPR, 2008, 133p. Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/16115/tese_Osmar_Roberto_Dalla_Santa.pdf;jsessionid=74710BF2CAE336B95E89BF4636D6F4A1?sequence=1> Acesso em: 01 junh. 2016

DEGENHARDT, R. **Sobrevivência de *Listeria Monocytogenes* de salame tipo italiano de baixa acidez, produzido sob condições brasileiras de fabricação**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Florianópolis: UFSC, 2006, 71p.

DE VALDEZ, G.F.; DE GIORI, G.S.; DE RUIZ HOLGADO, A.P.; OLIVER, G. Rehydration conditions and viability of freeze-dried lactic acid bacteria. **Cryobiology**, v. 22, p.574–577, 1985a.

DE VRIES, M.C.; VAUGHAN, E.E.; KLEEREBEZEM, M.; VOS, W.M. *Lactobacillus plantarum*-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 1018-1028, 2006.

DE VUYST, L.; FALONY, G.; LEROY, F. Review: Probiotics in fermented sausages. **Meat Science**, v. 80, p. 75–78, 2008.

DECKER, E. A. Healthier meat products as functional foods. **Meat Science**, v. 86, p. 49–55, 2010.

DESHPANDE, G.; RAO, S.; PATOLEA, S. Progress in the field of probiotics: year 2011. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 27, nr.1, p. 13-18, 2011.

DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J.; VAN IMPE, J. (b). Concentration of predict carbon dioxide in the water-phase as a parameter to model the effect of a modified

atmosphere on microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p.105-113, 1998.

DING, W.K.; SHAH, N.P. An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. **Journal of Food Science**, v.74, p.53-61, 2009.

DITTMER, M.; DURRANI, M.; LEHMANN, K. Acrylic polymers: a review of pharmaceutical applications. **S.T.P. Pharma Sci.**, Paris, v. 6, p. 403-437, 1997.

DUBEY, R.; SHAMI, T.C.; BHASKER RAO, K.U. Microencapsulation Technology and Applications. **Defence Science Journal**, v. 59, p. 82-95, 2009.

DUTCOSKY, S.D. **Análise Sensorial de Alimentos**. Curitiba: Champagnat, 531 p., 2013.

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

ENES, C.C.; SLATER, B. Obesidade na adolescência e seus principais fatores determinantes. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 13, n. 1, p. 163-171, 2010.

ERKKILÄ, S.; PETÄJÄ, E.; EEROLA, S.; LILLEBERG, L.; MATTILASANDHOLM, T.; SUIHKO, M-L. Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter culture. **Meat Science**, v. 59, p. 111-116, 2001.

ERSUS, S.; YURDAGEL, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. **Journal of Food Engineering**, v. 80, n. 3, p. 805-812, jun. 2007.

ESPOSITO, E.; CERVELLATI, F.; MENEGATTI, E.; NASTRUZZI, C.; CORTESI, R. Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. **International Journal of Pharmaceutics**. v.242, p.329–334, 2002.

EUROPEAN COMMISSION. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. **EFSA Journal**, v. 587, p.1–16, 2007.

FABIAN, C.B.; HUYNH, L.H.; JU, Y.H. Precipitation of rice bran protein using carrageenan and alginate. **LWT- Food Science Technology**, v. 43, p. 375-379, 2010.

FAO/WHO Experts' Report (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, 2001.

FÁVARO-TRINDADE, C.S et al. Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, n.2, p.103-112, 2008.

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; SANTANA, A.S.; MONTERREY-QUINTER, E.S., TRINDADE, M.A., NETTO, F.M. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 4, p. 336–340, jun. 2010.

FDA (Food and Drug Administration), 2009. Guidance for Industry: Evidence-based Review System for the Scientific Evaluation of Health Claims – Final. January 16, 2009.

FERNÁNDEZ, M.; ORDÓÑEZ, J. A.; BRUNA, J. M.; HERRANZ, B.; HOZ, L. Accelerated ripening of dry fermented sausages. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 201-209, 2000.

FERREIRA, J.S.; AYDOS, R.D. Prevalência de hipertensão arterial em crianças e adolescentes obesos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 15, n. 1, p. 97-104, 2010.

FRANK, J.F. YOUSEF, A.E. Tests for groups of microorganisms. In: WEHR, H. M. & FRANK, J. F (Eds.), **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. **American Public Health Association**, ed.17, p. 227-248, 2004.

FRITZEN-FREIRE, C.B.; PRUDÊNCIO, E.S.; AMBONI, R.D.M.C.; PINTO, S.S.; NEGRÃO-MURAKAMI, A.N.; MURAKAMI, F.S. Microencapsulation of Bifidobacteria by Spray Drying in the Presence of Prebiotics. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 306–312, 2012.

FRITZEN-FREIRE, C.B.; PRUDÊNCIO, E.S.; AMBONI, R.D.M.C.; PINTO, S.S.; NEGRÃO-MURAKAMI, A.N.; MURAKAMI, F.S. 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, 2013.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.365-378, 1989.

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

GARDINER, G. E., BOUCHIER, P., O'SULLIVAN, E., KELLY, J., KEVIN COLLINS, J., FITZGERALD, G., ET AL. A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. **International Dairy Journal**, v.12, n.9, p.749-756, 2002.

GARDINER, G.E.; O'SULLIVAN, E.; KELLY, J.; AUTY, M.A. E.; FITZGERALD, G.F.; COLLINS, J.K.; ROSS, R.P.; STANTON, C. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L salivarius* strains during heat treatment and spray drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2605-2615, jun. 2000.

GARDINI, F.; MARTUSCELLI, M.; CRUDELE, M.A.; PAPARELLA, A.; SUZZI, G. Use of *Staphylococcus xylosum* as a starter culture in dried sausages: effect on the biogenic amine content. **Meat Science**, v. 61, p. 275-283, 2002.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDOUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of *spray-drying* in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, Barking, v. 40, n 9, p. 1107-1121, nov. 2007.

GHARSALLAOUI, A. et al. Properties of spray-dried food flavours microencapsulated with two-layered membranes: Roles of interfacial interactions and water. **Food Chemistry**, v.132, n.4, p.1713-1720, 2012.

GILL, H. S., CROSS, M. L., RUTHERFURD, K. J., & GOPAL, P. K. Dietary probiotic supplementation to enhance cellular immunity in the elderly. **British Journal of Biomedical Science**, v.58, p.94-96, 2001.

GILLILAND, S. E. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v.87, n.1-2, p.175-188, 1990.

GISMONDO, M. R., DRAGO, L., & LOMBARDI, A. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.12, p.287-292, 1999.

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

GRECO, M.; MAZZETTE, R.; DE SANTIS, E. P. L.; CORONA, A.; COSSEDDU, A. M. Evolution and identification of lactic acid bacteria isolated during the ripening of Sardinian sausages. **Meat Science**, v. 69, p. 733-739, 2005.

HANSEN, L. T. L.; ALLAN-WOJTAS, P.M.; JIN, L. A.; PAULSON, A. T. Survival of Ca-Alginate microencapsulated Bifidobacterium spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v. 19, p. 35-45, 2002.(a)

HANSEN, E. B. Commercial bacterial starters cultures for fermented foods of the future. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.78, p. 119-131, 2002.

HAMADA, J. S. Characterization and Functional Properties of Rice Bran Proteins Modified by Commercial Exoproteases and Endoproteases. **Journal Food Science**, v. 65, p. 305-310, 2000.

HEENAN, C. N.; ADAMS, M.C.; HOSKEN, R.W.; FLEET, G.H. Growth Medium for Culturing Probiotic Bacteria for Applications in Vegetarian Food Products. **Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 171–176, 2002.

HEIDEBACH, L.T.; FORST, P.; KULOZIK, U. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1670-1677, 2009.

HEURTAULT, B.; SAULNIER,P.; PECH, B.; PROUST, J.E; BENOIT, J.P Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**. V.24, p. 4283-4300, 2003.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUS IN'T VELD, J. H. J. Overview of Gut Ora and Probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 85–101, 1998.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 365S–373S, 2001.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to Prebiotics and Probiotics. **Food Research International**, v. 35, n. 1, p. 109–116, 2002.

HOOPER, L.V.; GORDON, J. I. Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut. **Science**, v. 292, n. 5519, p. 1115-1118, 2001.

HUGAS, M.; MONFORT, J. M. Bacterial starter cultures for meat fermentation. **Food Chemistry**, Oxford, v. 59, n. 4, p.547--554,1997.

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, v.49, p. S 139- S150, 1998.

HUGHES, M. C.; KERRY, J. P.; ARENDT, E. K.; KENNEALLY, P. M.; MCSWEENEY, P. L. H.; O'NEILL, E. E. Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages. **Meat Science**, v. 62, p. 205–216, 2002

HUSEBEYE, E.; HELLSTROM, P. M.; SUNDLER, F.; CHEN, J.; MIDTVEDT, T. Influence of microbial species on small intestinal myoelectric activity and transit in germ-free rats. **Am Journal Physiology Gastrointestionaly Liver Physiology**, v. 280, n. 3, p. G368-80, 2001.

IBAÑEZ, C.; QUINTANILLA, L.; CID, C.; ASTIASARÁN, I.; BELLO, J. Dry fermented sausages elaborated with *Lactobacillus plantarum* – *Staphylococcus carnosus*. Parte II: Effect of partial replacement of NaCl with KCl on the proteolytic and insolubilization processes. **Meat Science**, v. 46, p. 277-284, 1997.

ICMSF. International Commission of Microbiological Specifications for Foods. **Microorganisms in foods. Their significance and methods of enumeration**. 2. ed. Toronto: University of Toronto Press, 1982.

ISLAM, M.A; CHEOL, H.Y;YUN, J.C; CHONG, S.C. Microencapsulation of live probiotic bacteria. **Journal of microbiologytechnology**,v.20, n.10, p.1367-1377, 2010.

ISOLAURI, E., ARVOLA, T., SUTAS, Y., MOILANEN, E., & SALMINEN, S. Probiotics in the management of atopic eczema. **Clinical and Experimental Allergy**, v.30, p.1604-1610, 2000.

JANKOVIC, I., SYBESMA, W., PHOTHIRATH, P., ANANTA, E., MERCENIER, A. Application of probiotics in food products – challenges and new approaches. **Current Opinion in Biotechnology**, v.21, n.2, p.175–181, 2010.

JAYA, S., DAS, H. Effect of maltodextrin, glycerol monostearate and tricalcium phosphate on vacuum dried mango powders properties. *Journal of Food Engineering*, v. 63, p. 125-134, 2004.

JENKINS, J. A.; BREITENEDER, H.; MILLS, E. N. Evolutionary distance from human homologs reflects allergenicity of animal food proteins. *Journal Allergy Clinical Immunology*, v. 120, p. 1399-1405, 2007.

JEON, Y.J.; VASANTHAN, T.; TEMELLI, F.; SONG, B.K. The suitability of barley and corn starches in their native and chemically modified forms for volatile meat flavor encapsulation. *Food Research International*, v. 36, p. 349-355, 2003.

JOYE, I.J.; McCLEMENTS, D.J. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, Amsterdam, v. 19, n. 5, p. 417-427, oct, 2014.

KAILASAPATHY, K. Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, *Nutrition and Natural Resources*, v. 4, n. 6, 2009.

KALSCHNE, D.L.; GEITENES, S.; VEIT, M.R.; SARMENTO, C.M.P.; COLLA, E. Growth Inhibition of Lactic Acid Bacteria in Ham by Nisin: A Model Approach. *Meat Science*, v. 98, n. 4, p. 744–752, 2014.

KALSCHNE, D.L.; WOMER, R.; MATTANA, A.; SARMENTO, C.M.P.; COLLA, L.M.; COLLA, E. Characterization of the Spoilage Lactic Acid Bacteria In 'sliced Vacuum-Packed Cooked Ham'. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 1, p. 173–181, 2015.

KARIMI, R.; SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A. M. Review Article: Sensory Characteristics of Probiotic Cheese. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 11, p. 437-452, 2012.

KENNEDY, G.; BURLINGAME, B. Analysis of Food composition data on rice from a plant genetic resources perspective. *Food Chemistry*, v. 80, p. 589-596, 2003.

KHAN, M. A.; REDDY, I. K. Controlled drug delivery: development of solid oral dosage forms with acrylate polymers. *S.T.P. Pharma Science*, Paris, v. 7, n. 6, p. 483-490, 1997.

KHA, T. C.; NGUYEN, M. H.; ROACH, P. D. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n.3, p.385-392, 2010.

KHAN, M.I. et al. Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages. **Food Research International**, v.44, n.10, p.3125-3133, 2011.

KHA, T. C.; NGUYEN, M. H.; ROACH, P. D.; STATHOPOULOS, C. E. Microencapsulation of gac oil by spray drying: Optimization of wall material concentration and oil load using response surface methodology. **Drying Technology: An International Journal**, v. 32, p. 385-397, 2014.

KIM, H. S., & GILLILAND, S. Lactobacillus acidophilus as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. **Journal of Dairy Science**, v.66, p.959–966, 1983.

KIM, S. J.; CHO, S.Y.; KIM, S.H. ; SONG, O. J.; SHIN, S.; CHA, D. S; PARK, H. J. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 493–500, 2008.

KLEEREBEZEM, M.; BOEKHORST, J.; VAN KRANENBURG, R.; MOLENAAR, D.; KUIPERS, O.P.; LEER, R.; TARCHINI, R.; PETERS, S.A.; SANDBRINK, H.M.; FIER, M.W.E.J., STIEKEMA, W.; KLEIN LANKHORST, R.M., BRON, P.A.; HOFFER, S.M., NIEROP GROOT, M.N., KERKHOVEN, R.; DE VRIES, M., URSING, B.; DE VOS, W.M.; SIEZEN, R.J. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 100,1990 e1995, 2003.

KOC, B.; YILMAZER, M.S.; BALKIR, P.; ERTEKIN, F.K. Spray drying of yoghurt: Optimization of process conditions for improving viability and other quality attributes. **Drying Technology**, v.28, p.495-507, 2010.

KOTZAMPASSI, K.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J. Probiotics for infectious diseases: more drugs, less dietary supplementation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p. 288-296, 2012.

KRUMMENAUER, E.P.; DE PARANHOS, G.O.; DA SILVA, J.F.; DA SILVA-BUZANELLO, R.A; KALSCHNE, D.L.; CORSO M.P.; CANAN, C. Salame tipo Milano com substituição parcial do toucinho por queijo mussarela. **Revista Cultivando o Saber**, v. 8, n. 2, p. 143-161, abril a junho de 2015.

KUMAR, P.; MISHRA, H.N.; Yoghurt poder – A review of process technology, storage and utilization. **Food and Bioproducts Processing**, v. 82, p. 133-142, 2004.

KUMAR, D.V.; MISHRA, A.; EASWARI, T.S. Formulation and Development of Acrycoat-Coated Chitosan Beads of Ornidazole for Colon Targeting. **European Journal of Applied Sciences**, v. 5, n. 2, p. 47–52, 2013.

LAM, P:L.; GAMBARI, R. Advanced progress of microencapsulation technologies: In vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries. Review. **Journal of Controlled Release**. v. 178 , p. 25–45, 2014.

LAPPE, R. **Influência do extrato hidroalcoólico de própolis sobre o desenvolvimento de fungos e características físico-químicas e sensoriais do salame tipo italiano**. 2004. 62 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

LAPSIRI, W.; BHANDARI, B.; WANCHAITANAWONG, P. Viability of *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 in different protectants during spray drying and storage. **Drying Technology**, London, p. 1407-1412, 2012.

LEAHY, S.C.; HIGGINS, D.G.; FITZGERALD, G.F.; VAN SINDEREN, D.A. Review: Getting Better With Bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p.1303-1315, 2005.

LECOMTE, F.; J. SIEPMANN, WALTHER M.; MACRAE R.J.; BODMEIER R. PH-Sensitive polymer blends used as coating materials to control drug release from spherical beads: elucidation of the underlying mass transport mechanisms. **Pharmaceutical Research**, v.22, ed.7, p.1129-1141, 2005.

LEISNER, J.J. Weeds, heat and pure cultures - On the differential success of new technologies in the Danish and American creamery industries in the 1890s. **Food Policy**, v.30, n.4, p. 419-433, 2005.

LEROY, F.; VERLUYTEN, J.; DE VUYST, L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p.270-285, 2006.

LI, X.M.; LIN, S.X.Q.; CHEN, X.D.; CHEN, L.Z.; PEARCE, D. Inactivation kinetics of probiotic bacteria during the drying of single milk droplets. **Drying Technology**. ed.24, v.6, p.695–701, 2006.

LI, H.; ZHU, K.; ZHOU, H.; PENG, W. Effects of high hydrostatic pressure treatment on allergenicity and structural properties of soybean protein isolate for infant formula. **Food Chemistry**, v.132, p.808–814, 2012.

LINDSAY, Robert C. Aditivos Alimentares. In: DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L.; FENNEMA, Owen R. Química de Alimentos de Fennema. Artmed, Porto Alegre, 4ed, 900p. 2010.

LOKSUWAN, J. Characteristics of microencapsulated [beta]-carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. **Food Hydrocolloids**, v.21, n.5-6, p.928-935. 2007.

LOURENS-HATTINGH, A., & VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, ed.11,v.1–2, p.1–17, 2001.

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

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

MACEDO, R. E. F.; PFLANZER, S. B.; TERRA, N. N.; FREITAS, R. J. S. Production of fermented sausage using probiotic *Lactobacillus* strains: quality characteristics. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2008.

MARTÍN, M.J.; LARA-VILLOSLADA, F.; RUIZ, M.A.; MORALES, M.E. Microencapsulation of Bacteria: A Review of Different Technologies and Their Impact on the Probiotic Effects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 27, p. 15–25, 2015.

MASSAGUER, P. R. D. 2006. Microbiologia Dos Processos Alimentares. São Paulo: Varela.

MATTEI, F. J. Culturas iniciadoras (*Lactobacillus plantarum* AJ2 e *Staphylococcus xylosum* U5) nas propriedades tecnológicas de embutido produzido com associação de carne suína e de frango. (Dissertação de Mestrado). Pelotas. Universidade Federal de Pelotas. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2014.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLARINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 173–182, 2002.

MEHTA, R.; CHAWLA, A.; SHARMA, P.; PAWAR, P. Formulation and *in vitro* evaluation of Eudragit S-100 coated naproxen matrix tablets for colon-targeted drug delivery system. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 4, p. 31-41, 2013.

MENDANHA, D.V.; ORTIZ, S.E.M.; FAVARO-TRINDADE, C.S.; MAURI, A.; MONTERREY-QUINTERO, E.S.; THOMAZINI, M. Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. **Food Research International**, v.42, p.1099-1104, 2009.

MENDES, A. C. G. et al. Salames tipo Milano elaborados com fibras de subprodutos da produção de vinho tinto. **Revista Ciência Rural**. v. 44, n.7. p.1291-1296, Santa Maria: UFSM/Centro de Ciências Rurais, jul. 2014,.

MENG, X. C.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; DALY, C.; ROSS, R. P. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1406–1416, 2008.

MITROPOULOU, G.; NEDOVIC, V.; GOYAL, A.; KOURKOUTAS, Y. A Review: Immobilization technologies in probiotic food production. **Journal of Nutrition and Metabolism**, p.1-15, 2003.

MOREIRA, G. E. G. **Obtenção e caracterização de extrato microencapsulado de resíduo agroindustrial de acerola**. 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Natal, 2007.

MORETTI, V. M.; MADONIA, G.; DIAFERIA, C.; MENTASTI, T.; PALEARI, M. A.; PANSERI, S.; PIRONE, G.; GANDINI, G. Chemical and microbiological parameters and sensory attributes of a typical Sicilian salami ripened in diferente conditions. **Meat Science**, v. 66, p. 845-854, 2004.

MOUSTAFINE, R.I.; BUKHOVETS, A.V.; SITENKOV, A.Y.; KEMENOVA, V.A.; ROMBAUT, P.; VAN DEN MOOTER, G. Eudragit E PO as a Complementary Material for Designing Oral Drug Delivery Systems with Controlled Release Properties: Comparative Evaluation of New Interpolyelectrolyte Complexes with Countercharged

Eudragit L100 Copolymers. **American Chemical Society: Mol. Pharmaceutics** v.10, p.2630–2641, 2013.

MOZZI, F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**. 1. ed. Wiley-Blackwell, 2010, 417p.

MURUGESAN, R.; ORSAT, V. *Spray Drying* for the Production of Nutraceutical Ingredients - A Review. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 5, n. 1, p. 3-14, jan. 2012.

NASSU, R. T.; GONÇALVES, L. A. G.; BESERRA, F. J. Efeito do teor de gordura nas características químicas e sensoriais de embutido fermentado de carne de caprinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 1169-1173, 2002.

NAZZARO, F. et al. Microencapsulation in food science and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.23, n.2, p.182-186, 2012.

NESTERENKO, A.; ALRIC, I.; SILVESTRE, F.; DURRIEU, V. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 42, p. 469-479, 2013a.

NEU, J. Gastroenterology and Nutrition: Neonatology Questions and Controversies Series. **Elsevier Health Science**, ed. 2, p. 1-430, 2012. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=Jbx_JIb1Tq8C&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 29 de setembro de 2015.

NIKAM, K.V.; KOTADE, K.B.; GAWARE, V.M.; DOLAS, R.T.; DHAMAK, K.B.; SOMWANSHI, S.B.; KHADSE, A.N.; KASHID, V.A. EUDRAGIT A VERSATILE POLYMER : A REVIEW. **Pharmacologyonline**, v.1, p.152-164, 2011.

NITSCHKE, M.; UMBELINO, D. C. Frutooligossacarídeos: novos ingredientes funcionais. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.36, n.1, p.27-34, 2002.

OECD-FAO Agricultural Outlook 2015-2024: Special Feature – Brazil: Prospects and Challenges. Group of Commodity Markets – Working Party on Agricultural Policies and Markets, p.26-27, March, 2015.

O'HAGAN, P.; HASAPIDIS, K.; CODER, A.; HELSING, H.; POKRAJA, G. **Particle size analysis of food powders**. In: Encapsulated and Powdered Foods. Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis. p. 215–245, 2005.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos Tecnológicos de Alimentos Funcionais Contendo Probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 1–21, 2002.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, PR, v. 20, n. 4, p. 641-650, ago./set. 2010.

OUWEHAND, A. C., KIRJAVAINEN, P. V., SHORTT, C., & SALMINEN, S. Probiotics: Mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**, v.9, n.1, p.43–52, 1999.

OUWEHAND, A.C., SALMINEN, S., AND ISOLAURI, E. Probiotics: An overview of beneficial effects, **Antonie van Leeuwenhoek**, v.82, p. 279-289, 2002.

OZYURT, V.H.; OTLES, S. Properties of probiotics and encapsulated probiotics in food. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v.13(4), p.413-424, 2014.

PALMIERI G., BONACUCINA G., DI MARTINO P., MARTELLI S. – Spray-drying as a method for microparticulate controlled release systems preparation: advantages and limits. I. **Water-Soluble Drugs. - Drug Development and Industrial Pharmacy**, **27**, 195-204, 2001.

PARRADO, J.; MIRAMONTES, E.; JOVER, M.; GUTIERREZ, J. F.; TERÁN, L. C.; BAUTISTA, J. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. **Food Chemistry**, v.98, p.742-748, 2006.

PELCZAR Jr., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia: conceitos e aplicações. v. 1, 2 ed. São Paulo: Makron Books,. 524 p. 1996.

PEIGHAMBARDOUST S.H., GOLSHAN T. A., HESARI J. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. **Trends in Food Science & Technology** v. 22, p.215-224, 2011.

PEREIRA, H.V.R.; SARAIVA, K.P.; CARVALHO, L.M.J.; ANDRADE, L.R.; PEDROSA, C.; PIERUCCI, A.P.T.R. Legumes seeds protein isolates in the production of ascorbic acid microparticles. **Food Research International**, v. 42, p. 115-121, 2009.

PÉREZ-ALVAREZ, J. A.; SAYAS-BARBERÁ, M. E.; FERNÁNDEZ-LOPEZ, J.; ARANDA-CATALÁ, V. Physicochemical characteristics of Spanish-type dry-cured sausage. **Food Research International**, Amsterdam, v.32, p.599-607, 1999.

PIARD, J.C; LOIR, Y.L; POQUET, I; LANGELLA, P. **Bactérias lácticas – As bactérias lácticas no centro dos novos desafios tecnológicos**. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento – encarte especial. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio08/encarte_8.pdf>. Acesso em: 25 mai. 2016.

PICOT, A. ; LACROIX, C. Production of Multiphase Water Insoluble Microcapsules for Cell Microencapsulation Using an Emulsification/Spray drying Technology. **Journal of Food Science**, v.68, n.9, p.2693-270, 2003.

PICOT, A.; LACROIX, C. Encapsulation of *bifidobacteria* in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal**, v.14, n.6, p.505-515, jun.2004. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05790.x/pdf>>. Acesso em: 02 de novembro de 2015.

PIERUCCI, A. P. T. R.; ANDRADE, L. R.; FARINA, M.; PEDROSA, C.; ROCHA-LEÃO, M. H. M. Comparison of a-tocopherol microparticles produced with different wall materials: pea protein a new interesting alternative. **Journal of Microencapsulation**, v.24, n.3, p.201-213, 2007.

PISPAN, S.; HEWITT, C.J.; STAPLEY, A.G.F. Comparison of cell survival rates of *E. coli* K12 and *L. acidophilus* undergoing spray drying. **Food and Bioprocess Processing**, v.91, n.4, p.362-369, 2013.

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

RANADHEERA, S.; EVANS, C.A.; ADAMS, M.C.; BAINES, S.K. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Propionibacterium jensenii* 702 by spray drying in goat's milk C. **Small Ruminant Research**, v.123, n.1, p.155-159, 2015.

RASIC, J. L. Microflora of the intestine probiotics. In B. Caballero, L. Trugo, & P. Finglas (Eds.), *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Oxford: Academic Press. p.3911–3916, 2003.

RIZQIATI, H.; BSLJENIE, B.S.L.; NURHIDAYAT, N .; NURWITRI, C. Survival of *Lactobacillus plantarum* Encapsulated with Skim Milk and rabic Gum after Spray Drying and Its Viability during Storage. **Journal of Animal Production**, v.10, n.3, p.179, 2008.

ROESSLER, E. B.; PANGBORN, R. M.; SLIDER, J.L; STONE, H. Expanded statistical tables for estimating significance in pared-preference, paired-difference, duo-trio and triangles tests. **Journal of Food Science**, v.43, 1978.

ROSS, R.P.; DESMOND, C.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.1410-1417, 2005.

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

SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J. M.; BRESSOLLIER, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT- Food Science and Technology**, v.50, p.1-16, 2013.

SAÉNZ, C.; TAPIA, S.; CHÁVEZ, J.; ROBERT, P. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). **Food Chemistry**, v.114, p.616-622, 2009.

SALMINEN, S., ISOLAURI, E.; SALMINEN, E. Clinical Uses of Probiotics for tabilizing the Gut Mucosal Barrier: Successful Strains and Future Challenges. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 70, p. 347–358, 1996

SAMELIS, J.; MAUROGENAKIS, F.; METAXOPOULOS, J. Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 179-196, 1994.

SAMELIS, J. & METAXOPOULOS, J. Incidence and principal sources of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* contamination in processed meats and a meat processing plant. **Food Microbiology**, v.16, p.465–477, 1999.

SAMESHIMA, T.; MAGOME, C.; TAKESHITA, K.; ARIHARA, K.; ITOH, M.; KONDO, Y. Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in fermented sausage. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, n. 1, p.1-7, 1998.

SANGUANSRI, P.; AUGUSTIN, M.A. Nanoscale materials development. A food industry perspective. **Trends in Food Science and Technology**, v.17, n.10, p.547-556, 2006.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. **Biotechnology Progress**, v. 23, p. 302-315, 2007.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology*, v. 105, p.1-13, 2008. Disponível em :<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2008.03744.x/epdf>>. Acesso em: 20 de Julho 2016.

SANZ, Y.; FLORES, J.; TOLDRA, F.; FERIA, A. Effect of pre-ripening on microbial and chemical changes in dry fermented sausages. **Food Microbiology**, v. 14, p. 575- 582, 1997.

SANTOS, R. C. S. **Microencapsulação de *Lactobacillus casei* por spray drying**. 2013. 105 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

SAVIJOKI, K.; INGMER, H.; VARMANEN, P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 71, p. 394–406, 2006.

SAYAS-BARBERÁ, E.; VIUDA-MARTOS, M.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, F. ; PÉREZ-ALVAREZ, J.A.; SENDRA, E. Combined Use of a Probiotic Culture and Citrus Fiber in a Traditional Sausage ‘Longaniza de Pascua’. **Food Control**, v. 27, n. 2., p. 343–50, 2012.

SCHROOYEN, P.M.M; VAN DER MEER, R; KRUIF, C.G. Microencapsulation: its application in nutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, p.475-479, 2001.

SEMYONOV, D.; RAMON, O.; KAPLUN, Z.; LEVIN-BRENER, L.; GUREVICH, N.; SHIMONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by Spray Freeze Drying. **Food Research International**, v.43, p.193–202, 2010.

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.

SIDIRA, M.; GALANIS, A.; NIKOLAOU, A.; KANELLAKI, M.; KOURKOUTAS, Y. Evaluation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 protective effect against spoilage of probiotic dry-fermented sausages. **Food Control**, v. 42, P. 315-320, 2014.

SIDIRA, M.; KANDYLIS, P.; KANELLAKI, M.; KOURKOUTAS, Y. Effect of immobilized *Lactobacillus casei* on volatile compounds of heat treated probiotic dry-fermented sausages. **Food Chemistry**, v.178, p. 201-207, 2015a.

SIDIRA, M.; KANDYLIS, P.; KANELLAKI, M.; KOURKOUTAS, Y. Effect of immobilized *Lactobacillus casei* on the evolution of flavor compounds in probiotic dry-fermented sausages during ripening. **Meat Science**, v.100, p. 41–51, 2015b.

SIEZEN, R.J., FRANCKE, C., RENCKENS, B., BOEKHORST, J., WELS, M., KLEEREBEZEM, M., VAN HIJUM, S.A.F.T. Complete resequencing and reannotation of the *Lactobacillus plantarum* WCFS1 genome. **Journal Bacteriology**. 194, 195e196. 2012

SIEZEN, R.J., TZENEVA, V.A., CASTIONI, A., WELS, M., PHAN, H.T.K., RADEMAKER, J.L.W.; STARRENBURG, M.J.C.; KLEEREBEZEM, M.; MOLENAAR, D.; VAN HYLCKAMA VLIEG, J.E.T. Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches. **Environmental Microbiology**.v.12,p. 758-773, 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. São Paulo: Varela, 2010.

SILVA, J.; FREIXO, R.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Spray-drying for the production of dried cultures. **International Journal Of Dairy Technology**, v.64, n. 3, p.321-335, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-0307.2011.00677.x/pdf>>. Acesso em: 02 de novembro de 2015.

SILVA, F. C ; FAVARO-TRINDADE, C. S ; ALENCAR, S. M ; THOMAZINI, M. ; BALIEIRO, J. C. C. Physicochemical properties, antioxidant activity and stability of

spray-dried propolis. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 3, n. 2, p. 94-100, 2011.

SILVA, F. C ; FONSECA, C. R.; ALENCAR, S. M ; THOMAZINI, M. ; BALIEIRO, J. C. C.; PITTIA, P. FAVARO-TRINDADE, C. S. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. **Food and bioproducts processing**. v. 9, n. 1, p. 28–36, 2013.

SILVA-BUZANELLO, R.A.; FERRO, A.C.; BONA, E.; CARDOZO-FILHO, L.; ARAÚJO, P.H.H.; LEIMANN, F.V.; GOLÇALVES, O.H. Validation of an Ultraviolet–visible (UV–Vis) technique for the quantitative determination of curcumin in poly(L-lactic acid) nanoparticles. **Food Chemistry**, v.172, p. 99–104, 2015.

SIMPSON P. J., STANTON C., FITZGERALD G.F., ROSS R.P. Intrinsic tolerance of Bifidobacterium species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.493-501, 2005.

SINGH, S; DIXIT, D. A review on spray drying: emerging technology in food industry. **International Journal of Applied Engineering and Technology**, Jaipur, v. 4, n. 1, p. 1-8, jan./mar. 2014.

SOLANKI, H. K.; PAWAR, D. D.; DUSHYANT, A. S.; PRAJAPATI, V. D.; JANI, G. K.; MULLA, A. M.; THAKAR, P.M. Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. **BioMed Research International**, p.1–21,2013.

SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P. Microencapsulation of Ketoprofen in Blends of Acrylic Resins by Spray Drying. **Drying Technology**, v. 30, n. 3, p. 263–275, 2012.

SOYER, A.; ERTAS, A. H.; ÜZÜMCÜOĞLU, Ü. Effect of processing conditions on the quality of naturally fermented Turkish sausages (sucukus). **Meat Science**, v. 69, p.135-141, 2005.

STANIER, R. Y.; INGRAHAM, J. L.; WHEELIS, M. L.; PAINTER, P. R. **General Microbiology**, 5 ed., Hong Kong, Macmillan Press Ltd., p. 495-504, 1995.

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

SYBESMA, W.; HUGENHOLTZ, J.; de VOS, W.M. Safe use of genetically modified lactic acid bacteria in food. Bridging the gap between consumers, green groups, and industry. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 424–448, 2006.

TEIXEIRA, Evanilda; MEINERT, Elza M; BARBETTA, Pedro A. **Análise Sensorial de Alimentos**. Florianópolis: UFSC, 1987.

TEIXEIRA, P.C.; CASTRO, M.H.; MALCATA, F.X.; KIRBY, R.M. Survival of *Lactobacillus-delbrueckii* ssp. *bulgaricus* following spray-drying. **Journal of Dairy Science**. v.78, p.1025–1031, 1995.

TERRA, N.N. Apontamentos de Tecnologia de Carnes. Ed. UNISINOS, p.51-126, 2003.

THAKRAL, S.; THAKRAL, N.K.; MAJUMDAR, D.K. Eudragit®: a technology evaluation. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v.10, n.1, p.131-149, 2013.

TIWARI, R.; SRIVASTAVA, B.; TIWARI, G.; RAI, A. Extended release promethazine HCl using acrylic polymers by freeze-drying and spray-drying techniques: formulation considerations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 4, 2009.

TONON, R.V.; BRABET, C.; HUBINGER, M.D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v.88, n.3, p.411-418, 2008.

TONON, R.V.; BRABET, C.; HUBINGER, M.D. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico-químicas do suco de açai em pó. **Food Science and Technology**, v.29, n.2, 2009.

TONON, R.V.; BRABET, C.; PALLET, D.; BRAT, P.; HUBINGER, M.D. Physicochemical and morphological characterisation of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, p.1950–1958, 2009.

TOSONI S.F.; RODRIGUES, V.C. **Características físico-químicas e antioxidantes de própolis microencapsulada com diferentes tipos de materiais encapsulantes**. (Trabalho de Conclusão de Curso). Mourão. Universidade Tecnológica Federal do Paraná campus Mourão. Curso superior de Tecnologia de Alimentos, 2013.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. Probiotics Market (Dietary Supplements, Animal Feed, Foods & Beverages) – Global Industry Size, Share, trends, Analysis, Growth And Forecast, 2012-2018. (2013). Disponível em: <<http://www.transparencymarketresearch.com/probiotics-market.html>. Acesso em: 31.maio.2016.

VEIGA, R. S. **Eugenol microencapsulado em carragena combinada com proteínas do leite, do farelo de arroz e albumina sérica bovina por atomização**. 2015. 114 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira. 2015.

VILLANOVA, J. C. **Desenvolvimento de comprimidos de liberação modificada contendo cloridrato de propranolol : avaliação do perfil de dissolução**. 2001. 194 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

UMER, H.; NIGAM, H.; TAMBOLI, A.M.; NAINAR, M. S. M. Microencapsulation: Process, Techniques and Applications. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 474–481, 2011.

WANG, M.; HETTIARACHCHY, N.S.; QI, M.; BURKS, W.; SIEBENMORGEN, T. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.411-416, 1999.

WANG, Y.C.; YU, R.C.; CHOU, C.C. Viability of lactic acid bacteria and Bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. **International Journal of Food Microbiology**. v.93, p. 209– 217, jul. 2004.

YOW, H. N., ROUTH, A.F. Release profiles of encapsulated actives from colloidosomes sintered for various durations. **Langmuir**, v.6; n.1, p.159-66, 2009.

ZANARDI, E.; DORIGONI, V.; BADIANI, A.; CHIZZOLINI, R. Lipid and colour stability of Milano-type sausages: effect of packing conditions. **Meat Science**, Oxford, v.61, n.1, p.7-14, 2002.

ZOTARELLI, M. F. **Produção e Caracterização de manga desidratada em pó por diferentes processos de secagem**. 2014. 165 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Florianópolis, 2014.

ZUIDAM, N.J; SHIMONI, E. Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. In: ZUIDAM, N.J; NEDOVIC, V.A. **Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing.** 2010.