



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EVELLYN MAYARA DIAS CARVALHO DA SILVA

**APLICAÇÃO DE PROBIÓTICOS MICROENCAPSULADOS EM ALIMENTO
CÁRNEO: UM ESTUDO DE VIABILIDADE A ALTAS TEMPERATURA DE
COZIMENTO**

Recife
2025

EVELLYN MAYARA DIAS CARVALHO DA SILVA

**APLICAÇÃO DE PROBIÓTICOS MICROENCAPSULADOS EM ALIMENTO
CÁRNEO: UM ESTUDO DE VIABILIDADE A ALTAS TEMPERATURA DE
COZIMENTO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biologia.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Maria Taciana Holanda Cavalcanti

Coorientador (a): Dr. Leandro Fragoso Lins

Recife

2025

EVELLYN MAYARA DIAS CARVALHO DA SILVA

**APLICAÇÃO DE PROBIÓTICOS MICROENCAPSULADOS EM ALIMENTO
CÁRNEO:UM ESTUDO DE VIABILIDADE A ALTAS TEMPERATURA DE
COZIMENTO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biologia.

Aprovado em: 21 de fevereiro de 2025

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Maria Taciana Holanda Cavalcanti (Orientadora)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Juanize Matias da Silva Batista (Examinador Interno)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Ms. Alessandra Silva Araújo (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho à minha mãe Patrícia, avó Edna, Tia Silvia e ao meu noivo Antônio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha família, que foi meu alicerce em todos os momentos. O amor, o apoio incondicional e a força de vocês foram fundamentais para que eu pudesse alcançar esta conquista. E ao meu noivo, Antônio, por todo o auxílio e incentivo durante os 4 anos de graduação.

Aos meus professores, em especial à Prof^a Taciana e ao Prof. Leandro, pela orientação, paciência e inspiração constantes. Suas lições ultrapassaram os limites acadêmicos e me ensinaram que a ciência é, acima de tudo, uma jornada coletiva de aprendizado e descoberta.

À todos que compõe o LABTECBIO, o laboratório que entrei no início da graduação e me ajudou em todos os processos acadêmicos durante esses anos. As conversas diárias com pesquisadores de cada um dos grupos me fizeram conhecer diversas áreas na ciência e obter um olhar mais crítico em tudo o que eu desenvolvia dentro do laboratório nesses 3 anos de convivência.

Aos amigos que estiveram ao meu lado (Sara, Emanuel, Maria Laura, Kelvin, Renata, Lívia, Rafael, Malu, Gabriel, Zé) compartilhando o entusiasmo pelo conhecimento, os desafios e as vitórias. A convivência com vocês tornou essa trajetória muito mais rica e significativa.

E, por fim, agradeço a mim mesma, pela coragem de enfrentar cada desafio, pela resiliência diante dos obstáculos e pela determinação em transformar sonhos em realidade.

Esta conquista é o resultado do esforço conjunto de todos que acreditaram em mim e me ajudaram a chegar até aqui. Meu sincero e profundo obrigada a todos vocês.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo, fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

Os probióticos são microrganismos vivos que consumidos em quantidades adequadas oferecem benefícios à saúde, e quando aplicados em alimentos cárneos podem ser uma alternativa para diversificar as opções de alimentos funcionais no mercado, alinhando-se à demanda dos consumidores por opções de alimentos mais saudáveis. Entretanto, o processamento, a exposição a altas temperaturas que são utilizadas em alimentos cárneos e a digestão gastrointestinal são fatores que diminuem a quantidade de células viáveis desses microrganismos, afetando sua funcionalidade. A microencapsulação de probióticos tem se mostrado uma técnica eficaz para proteger esses microrganismos contra condições desfavoráveis antes de alcançarem o intestino, seu sítio alvo de ação. Portanto, o objetivo deste trabalho foi aplicar probióticos microencapsulados em alimento cárneo e estudar a viabilidade desses probióticos a altas temperaturas de cozimento. Foram utilizadas as técnicas de extrusão e gelificação iônica para produção de microcápsulas probióticas de *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG ($\sim 10^{15}$ UFC/mL) e os polímeros alginato de sódio (1%) e whey protein (1%). Os probióticos microencapsulados e células livres foram aplicados no alimento carne hambúrguer e submetido às condições de cozimento à temperaturas até 130 °C e posteriormente também foi submetido a digestão gastrointestinal simulada *in vitro*. Os resultados mostraram que os probióticos microencapsulados aplicados no hambúrguer e submetidos a altas temperaturas foram mais eficientes, mantendo uma viabilidade celular de aproximadamente 70%. Esse resultado também foi visto durante a digestão gastrointestinal *in vitro*, onde as células livres não apresentaram nenhuma viabilidade, diferentemente do probiótico microencapsulado, que apresentou 76% de viabilidade celular após digestão. Conclui-se que o método de encapsulação de probióticos foi eficiente para proteção e aplicação desses microrganismos em alimento cárneo do tipo hambúrguer, se mostrando viável durante o cozimento e digestão, trazendo assim perspectivas de produção de novos alimentos cárneos funcionais probióticos.

Palavras-chave: *Lactocaseibacillus rhamnosus*, Hambúrguer funcional, Estresse térmico, Digestão gastrointestinal

ABSTRACT

Probiotics, which are live microorganisms that, when consumed in adequate amounts, offer health benefits, can be an alternative to diversify the options of functional foods in the market when applied to meat products. This aligns with the growing consumer demand for healthier food options. However, processing, exposure to high temperatures commonly used in meat products, and gastrointestinal digestion are factors that reduce the number of viable cells of these microorganisms, affecting their functionality. Probiotic microencapsulation has proven to be an effective technique to protect these microorganisms against unfavorable conditions before they reach the intestine, their target site of action. Therefore, the objective of this study was to apply microencapsulated probiotics to a meat product and evaluate the viability of these probiotics under high cooking temperatures. The techniques of extrusion and ionic gelation were used to produce probiotic microcapsules of *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG ($\sim 10^{15}$ UFC/mL) using the polymers sodium alginate (1%) and whey protein (1%). The microencapsulated probiotics and free cells were applied to a meat product (hamburger) and subjected to cooking conditions at temperatures up to 130 °C. Subsequently, they were also subjected to simulated in vitro gastrointestinal digestion. The results showed that the microencapsulated probiotics applied to the hamburger and exposed to high temperatures were more effective, maintaining a cell viability of approximately 70%. This result was also observed during in vitro gastrointestinal digestion, where the free cells showed no viability, unlike the microencapsulated probiotics, which exhibited 76% cell viability after digestion. In conclusion, the probiotic encapsulation methods were efficient in protecting and applying these microorganisms to a meat product like hamburgers, demonstrating viability during cooking and digestion. This opens up prospects for the production of new functional probiotic meat products.

Keywords: *Lactocaseibacillus rhamnosus*, Functional hamburger, Thermal stress, Gastrointestinal digestion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Principais gêneros probióticos utilizados em alimentos.	16
Figura 2 - Esquema das cápsulas probióticas indicando a camada protetora formada pelos polímeros que envolve os bioativos (probióticos)	18
Figura 3 - Produção de biomassa de <i>L. rhamnosus</i> GG em Biorreator Tecnal TEC-BIO-PLUS.	24
Figura 4 - Vista frontal da unidade de controle Encapsulador B-395 PRO	26
Figura 5 - Processo de cozimento dos alimentos cárneos.	28
Figura 6 - Fluxograma do desenho experimental utilizado para avaliação de viabilidade e estabilidade das microcápsulas probióticas frente a digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> .	29
Figura 7 - Caracterização morfológica da cepa probiótica <i>L. rhamnosus</i> GG.	32
Figura 8 - Caracterização da morfologia das microcápsulas úmidas por microscopia óptica (objetiva de 5x) e fotografia padrão	33
Figura 9 - Caracterização da morfologia das microcápsulas A1%W1% secas por microscopia eletrônica de varredura com um aumento de 100x.	34
Figura 10 - Viabilidade probiótica das microcápsulas A1%W1% e Célula livre incorporado no alimento cárneo hambúrguer e submetido a altas temperaturas de cozimento	35
Figura 11 - Contagem da concentração de <i>L. rhamnosus</i> GG encapsulada após a digestão em placa de petri com meio MRS ágar.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Condições utilizadas para a produção de biomassa probiótica no Biorreator TEC-BIO-PLUS (Tecnal)	23
Tabela 2	– Parâmetros utilizados no processo de microencapsulação probiótica pela técnica de Extrusão e Gelificação Iônica no Encapsulador B395 PRO	25
Tabela 3	– Condições utilizados no processo de cozimento dos alimentos cárneos tipo hambúrguer com as microcápsulas e célula livre	28
Tabela 4	– Rendimento (RE) e Eficiência (EE) de microencapsulação probiótica A1%W1% (Alginato de sódio 1% + Whey protein 1%)	32
Tabela 5	– Eficiência de viabilidade probiótica das microcápsulas (A1%W1%) e das células livres durante a simulação da digestão gastrointestinal <i>in vitro</i>	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Probióticos	16
2.2 Microencapsulação de Probióticos	18
4 METODOLOGIA	23
4.1 Microorganismo probiótico utilizado	23
4.2 Produção de biomassa probiótica	23
4.3 Microencapsulação de probióticos pela técnica de extrusão e gelificação iônica	24
4.4 Avaliação do rendimento e eficiência do processo de microencapsulação	26
4.5 Caracterização microscópica das microcápsulas probióticas	27
4.6 Aplicação de probióticos microencapsulados em alimento cárneo tipo hambúrguer	27
4.7 Viabilidade probiótica do hambúrguer submetido a altas temperaturas de cozimento	28
4.8 Viabilidade probiótica do hambúrguer cozido frente a digestão gastrointestinal simulada in vitro	29
4.9 Análises estatísticas	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Rendimento e eficiência de encapsulação	31
5.2 Caracterização da morfologia da cepa de <i>L. rhamnosus</i> e das Microcápsulas secas e úmidas por Microscopia óptica e Microscopia eletrônica de varredura	32
5.3 Viabilidade probiótica do alimento cárneo submetido a altas temperaturas de cozimento	34
5.4 Estudo da viabilidade e estabilidade das microcápsulas probióticas aplicadas em alimento cárneo frente a digestão gastrointestinal simulada in vitro após o cozimento	36
6 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

O consumo de carne de origem animal cresceu nos últimos 50 anos, e os consumidores buscam opções de maior qualidade. Essa demanda por proteínas animais tem se intensificado, impulsionada pelo crescimento da população global. Um estudo recente indicou que a produção mundial de carne alcançou 263 milhões de toneladas em 2018, e estima-se que aumentará para 445 milhões de toneladas até 2050 para atender às necessidades do mercado (Saha *et al.*, 2023). Essa situação representa uma grande oportunidade de mercado para a criação de produtos cárneos funcionais e mais saudáveis.

Os probióticos são microrganismos vivos que consumidos em quantidades adequadas oferecem benefícios à saúde, e quando aplicados em alimentos cárneos podem ser uma alternativa para diversificar as opções de alimentos funcionais no mercado, alinhando-se à demanda dos consumidores por opções de alimentos mais saudáveis. Os principais microrganismos utilizados como probióticos em alimentos pertencem aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Escherichia* e *Enterococcus* (Fijan; Haar; Varga, 2021).

Os probióticos devem permanecer viáveis durante toda a vida útil de um produto alimentício, em concentrações estabelecidas pelas legislações vigentes previamente aprovadas em dose-resposta. Esse requisito impacta significativamente a seleção das cepas utilizadas em produtos cárneos. Para compensar a redução nos níveis de probióticos durante a digestão gastrointestinal, a concentração recomendada é de aproximadamente 10^8 a 10^9 UFC/g ou mL de alimento (WGO, 2017). Esses benefícios decorrem de diversos mecanismos de ação, incluindo a inibição de bactérias patogênicas por meio de alterações no pH e na disponibilidade de oxigênio, produção de bacteriocinas, síntese de micronutrientes essenciais como vitaminas e aminoácidos e enzimas, aumento da biodisponibilidade de nutrientes e estímulo do sistema imunológico (Manassi *et al.*, 2022).

A microencapsulação de probióticos tem se mostrado uma técnica eficaz para proteger esses microrganismos contra condições desfavoráveis antes de alcançarem o sítio alvo. Os materiais encapsulantes, ou materiais de parede, funcionam como um biofilme, preservando as células probióticas da oxidação, do ácido gástrico, do processamento de alimentos, entre outros agentes químicos e biológicos. Outra vantagem é a prevenção da inativação do probiótico e a estimulação da produção e excreção de metabólitos secundários (Nazzaro *et al.*, 2012; Goderska; Pena, 2023).

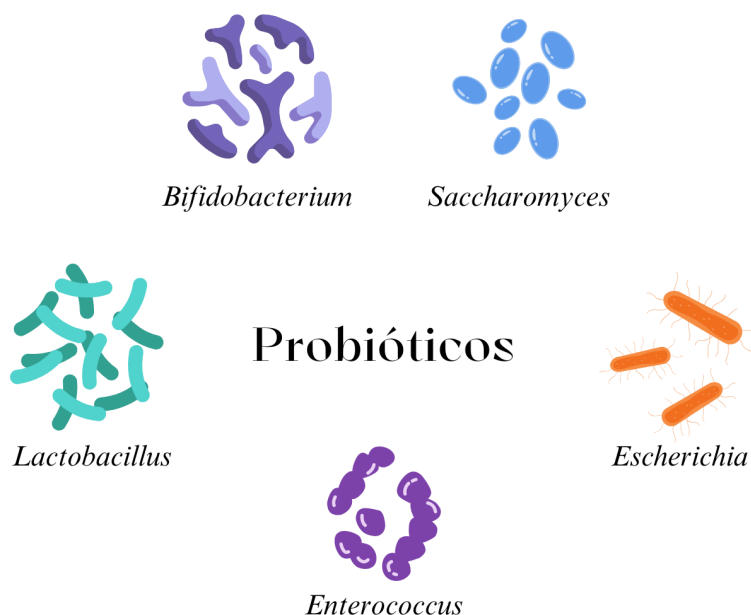
No entanto, os estudos sobre microencapsulação de probióticos ainda estão majoritariamente voltados para a aplicação em alimentos lácteos e sem avaliar a proteção a condições extremas, por exemplo em altas temperaturas. Com isso, é importante o desenvolvimento de pesquisas que avaliem a aplicação de probióticos microencapsulados em alimentos cárneos diversos, para verificar sua proteção contra altas temperaturas de processamento ou cozimento, além da viabilidade após a digestão gastrointestinal, garantindo concentrações viáveis no intestino para promover os benefícios esperados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Probióticos

Os probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios aos hospedeiros (FAO/WHO, 2002; Hill et al., 2014). A adição de probióticos em produtos cárneos representa uma estratégia promissora para amplificar os benefícios à saúde. Contudo, as condições adversas encontradas nesses alimentos, especialmente durante o armazenamento em temperaturas baixas e o cozimento em altas temperaturas, podem comprometer a viabilidade desses microrganismos. Estudos demonstram que a refrigeração prolongada reduz significativamente a carga microbiana em alimentos fermentados e iogurtes probióticos (Cabello-Olmo et al., 2020), enquanto o calor intenso durante o cozimento pode eliminar microrganismos patogênicos e probióticos, sendo que alguns probióticos podem ter sua sobrevivência melhorada por processos como microencapsulação (Jonathan et al., 2023).

Figura 1 - Principais gêneros probióticos utilizados em alimentos.



Fonte: o autor, 2024.

Entre os principais probióticos utilizados em alimentos, destacam-se diversas espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Escherichia* e *Enterococcus* (Fijan; Haar; Varga, 2021). Os benefícios à saúde associados ao consumo de probióticos estão

relacionados à sua influência positiva na microbiota intestinal. Para garantir a eficácia dos probióticos, é fundamental que permaneçam viáveis ao longo da vida útil do produto, em concentrações que garantam a resposta desejada (Hill *et al.*, 2014; Manassi *et al.*, 2022). Recomenda-se uma ingestão de aproximadamente 10^8 a 10^9 UFC/g ou mL de alimento para compensar a perda de populações probióticas durante a passagem pelo trato gastrointestinal (WGO, 2017).

Utilizar carne como matriz para probióticos é uma opção promissora, especialmente em produtos como carnes curadas e fermentadas, que não sofrem tratamento térmico, ajudando a preservar a viabilidade dos microrganismos probióticos (Kalschne *et al.*, 2019; Sirini *et al.*, 2021). Entretanto, vários fatores tecnológicos, como pH, acidez, composição da matriz, atividade de água, presença de aditivos (como cloreto de sódio, nitritos e nitratos) e temperatura durante processamento e armazenamento, podem influenciar a sobrevivência dessas células (Aspri; Papademas; Tsaltas., 2020). Além disso, a aceitação sensorial representa um desafio significativo, já que as propriedades sensoriais dos alimentos podem ser alteradas pela produção de diferentes metabólitos, como ácidos orgânicos, durante o processamento (Cohen *et al.*, 2023).

As cepas do gênero *Lacticaseibacillus* têm sido amplamente utilizadas na indústria alimentícia devido às suas propriedades probióticas e bioprotetoras. No setor de carnes, essas bactérias demonstraram grande potencial na bioconservação de produtos fermentados, como embutidos, ajudando a controlar microrganismos indesejáveis e melhorar a segurança alimentar. Estudos recentes indicam que *Lacticaseibacillus paracasei* pode ser utilizado na produção de embutidos fermentados, reduzindo a atividade de patógenos e melhorando a estabilidade do produto ao longo do tempo. Além disso, sua capacidade de reduzir a atividade da água e modular o pH contribui para a conservação da carne, tornando-a uma alternativa natural aos conservantes químicos (Bertuci et al., 2023)

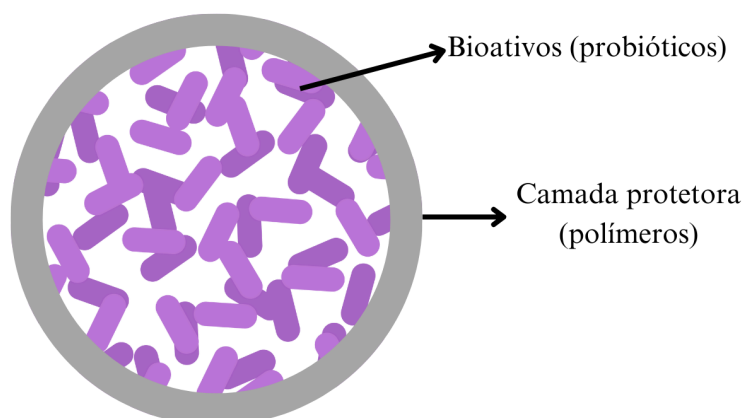
Da mesma forma, *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (LGG) é uma das cepas probióticas mais estudadas e amplamente utilizadas devido às suas propriedades benéficas à saúde humana. Esse microrganismo apresenta alta resistência a condições adversas do trato gastrointestinal, como a acidez estomacal e a presença de sais biliares, o que contribui para sua capacidade de colonização intestinal (Strickertsson *et al.*, 2021). Um dos diferenciais da LGG é a presença de pili heterotriméricos SpaCBA, que desempenham um papel crucial na adesão ao muco intestinal e na interação com células hospedeiras (Tytgat *et al.*, 2021). Além disso, a LGG tem demonstrado propriedades imunomoduladoras, auxiliando na redução da

inflamação e no fortalecimento da barreira intestinal, sendo frequentemente utilizado em produtos lácteos fermentados e suplementos probióticos (Mao *et al.*, 2020). Entretanto, não há estudos que explorem a aplicação de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (LGG) em alimentos cárneos, nos quais testem temperaturas extremas e a digestão gastrointestinal seja avaliada.

2.2 Microencapsulação de Probióticos

A microencapsulação se destaca como uma estratégia eficaz para proteger os probióticos e garantir que eles cheguem de forma segura e ativa ao local de ação no organismo, preservando seus benefícios. Microcápsulas são utilizadas para encapsular compostos bioativos, protegendo-os de fatores ambientais como umidade e oxigênio, além de regular a liberação, solubilidade e biodisponibilidade dos ingredientes. Esse processo facilita o manuseio e transporte, ao mesmo tempo que oculta sabores e odores indesejáveis. As cápsulas geralmente têm formatos esféricos ou elipsóides, e sua eficácia pode ser influenciada pelas características do material da parede, pelos bioativos encapsulados, pelo método de preparação e pelas condições de secagem (Bhardwaj *et al.*, 2024).

Figura 2 - Esquema das cápsulas probióticas indicando a camada protetora formada pelos polímeros que envolve os bioativos (probióticos)



Fonte: o autor, 2024.

A microencapsulação de probióticos é fundamental para superar os efeitos deletérios do trato gastrointestinal e do processamento de alimentos, aumentando sua eficácia, estabilidade e biodisponibilidade. Esse método cria um microambiente ideal para os probióticos (Akbari *et al.*, 2023; Sun *et al.*, 2023). Os métodos de encapsulamento podem ser classificados em duas categorias principais: técnicas químicas, como coacervação, gelificação

iônica e inclusão molecular, e técnicas físicas, incluindo secagem por pulverização, liofilização, resfriamento por pulverização, extrusão, secagem em leito fluidizado, eletropulverização e eletrofiação. A manutenção da viabilidade das células probióticas, é crucial durante o processo de encapsulamento (Han *et al.*, 2024). As técnicas mais comuns empregadas para encapsular probióticos incluem liofilização, secagem por pulverização, gelificação iônica e coacervação complexa (Bhardwaj *et al.*, 2024).

A liofilização é um método de desidratação ideal para encapsular substâncias sensíveis ao calor, envolvendo três estágios principais (Dong *et al.*, 2022). Inicialmente, os ingredientes são congelados rapidamente para criar cristais de gelo que protegem a estrutura celular, com congelamento completo necessário para sublimação eficaz. A velocidade do congelamento influencia a qualidade do produto, com congelamento lento recomendado para líquidos para formar cristais maiores, enquanto o congelamento rápido é melhor para sólidos. O segundo estágio envolve a remoção de água em duas partes: a sublimação reduz a umidade para cerca de 15%, seguida pela evaporação que a diminui ainda mais para cerca de 2%. Este processo ocorre em uma câmara de vácuo onde o vapor de água é continuamente removido. No estágio final, o calor é aplicado em um nível igual ao calor latente da sublimação, garantindo que o valor nutricional permaneça intacto. Embora eficaz para a maioria dos ingredientes alimentícios, a liofilização é mais cara — até cinco vezes o custo da secagem por pulverização — e também é usada para encapsular bebidas solúveis em água, perfumes naturais e medicamentos, como visto em produtos como proteínas em pó e pó de curcumina liofilizado, que recuperam suas propriedades bioativas após a reidratação (Stabrauskiene *et al.*, 2024).

A secagem por pulverização é um processo de desidratação simples e econômico usado principalmente para proteger prebióticos sensíveis ao calor em escala industrial. Ele serve como uma técnica de encapsulamento onde os bioativos são dissolvidos, emulsionados ou dispersos em uma solução aquosa ou orgânica com um agente encapsulante, seguido por homogeneização e pulverização em uma câmara de secagem (Khairani *et al.*, 2024). O processo começa com a formulação líquida sendo bombeada e pulverizada na câmara, onde o ar quente a converte em pequenas gotículas. Os tipos comuns de bicos incluem pulverizadores de disco centrífugo, bicos pneumáticos e bicos de pressão, cada um com eficiência e adequação variáveis para diferentes viscosidades. A homogeneização no início garante uma solução estável e de baixa viscosidade, produzindo gotículas menores que aumentam a eficiência da secagem. A rápida evaporação do líquido ocorre devido ao pequeno tamanho das gotículas, aumentando o contato da superfície com o ar quente, que pode ser atmosférico ou

gás inerte para produtos inflamáveis. Finalmente, as partículas secas são coletadas no fundo da câmara e filtradas do fluxo de gás. A secagem por pulverização produz efetivamente partículas probióticas relativamente grandes, usando materiais de parede como proteínas, amidos e polissacarídeos, com trealose, maltodextrina, goma arábica e proteína de soro de leite protegendo a membrana e mantendo o teor de umidade e o tamanho das partículas (Jayaprakash *et al.*, 2023).

A microencapsulação via coacervação complexa ocorre em três estágios com agitação contínua. Primeiro, três componentes quimicamente imiscíveis são formados: o meio central, o fluido de montagem e a substância de revestimento. No segundo estágio, a substância base se difunde na solução de revestimento. O estágio final envolve a solidificação da camada externa por meio de reações de reticulação química ou física. Essa técnica é de baixo custo, oferece alta capacidade de carga, garante fácil liberação e não requer solventes orgânicos ou condições extremas para endurecer a casca do núcleo. Vários materiais usados neste processo incluem polissacarídeos como goma arábica, quitosana, pectina e gelatina, bem como proteínas como soro de leite, caseína, albumina e proteínas vegetais como provindas de ervilha e soja (Li;Wang; Mei, 2021; ; Xu *et al.*, 2022; Bordón *et al.*, 2023; Napiórkowska *et al.*, 2024).

A gelificação iônica é uma técnica de encapsulamento baseada em interações eletrostáticas entre cargas opostas, geralmente envolvendo um polímero. Esse método é amplamente utilizado para formar partículas de alginato. O processo inicia-se com a adição de uma solução aquosa de polímero contendo íons de baixa massa molecular a uma solução com eletrólitos de carga oposta (como CaCl_2 ou BaCl_2), resultando na formação de um gel insolúvel. A mistura é agitada vigorosamente, permitindo a formação de partículas esféricas por complexação. Após a filtração, as esferas são lavadas e secas. Essa técnica é simples, econômica e rápida, sem necessidade de equipamentos especializados, altas temperaturas ou solventes orgânicos. No entanto, apresenta a limitação de gerar partículas com tamanhos irregulares (Nayak & Hasnain, 2020; Velázquez-Gutiérrez *et al.*, 2020).

A extrusão é frequentemente utilizada em conjunto com a gelificação iônica para aprimorar o encapsulamento. Esse método emprega pressão mecânica para forçar a solução contendo o material ativo através de um bico ou matriz, formando cápsulas de maior tamanho e com alta carga de bioativos. Além disso, permite a incorporação de células vivas, como probióticos, sem comprometer sua viabilidade por altas temperaturas ou solventes agressivos (Silva *et al.*, 2023). Apesar dessas vantagens, a extrusão apresenta desafios, como baixa taxa

de produção e necessidade de controle preciso da viscosidade da solução e do diâmetro da agulha para garantir a uniformidade das partículas (Velázquez-Gutiérrez et al., 2020).

2.3 Carnes como um alimento funcional probiótico

As carnes e seus derivados continuam a ser uma parte essencial da dieta de muitas pessoas em todo o mundo, devido ao seu elevado valor nutricional e versatilidade. Elas são amplamente reconhecidas como fontes completas de proteínas de alta qualidade, além de conter vitaminas e minerais fundamentais, como ferro, zinco, selênio e vitaminas do complexo B, que desempenham papéis importantes na imunidade, metabolismo energético e transporte de oxigênio no sangue (Kalyuzhnaya; Orlova; Karpenko, 2023).

Apesar de seus benefícios nutricionais, há preocupações crescentes em relação a compostos encontrados em produtos cárneos, como gorduras saturadas, colesterol e sódio, que têm sido associados ao risco de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e câncer colorretal (Karwowska *et al.*, 2022). Essas preocupações impulsionaram o desenvolvimento de alternativas mais saudáveis, como carnes reformuladas com menor teor de sódio e gordura, atendendo à demanda dos consumidores por alimentos mais funcionais (Kulazhanov *et al.*, 2023).

Uma estratégia promissora no desenvolvimento de carnes funcionais é a incorporação de ingredientes bioativos, como probióticos, prebióticos, ácidos graxos insaturados e antioxidantes naturais, que promovem benefícios à saúde, como a melhoria da saúde intestinal e a redução do colesterol LDL (Karwowska *et al.*, 2022; Macho-González *et al.*, 2021). Estudos também indicam que a adição de compostos vegetais, como fibras e polifenóis, melhora o perfil funcional dos produtos cárneos, mantendo suas características sensoriais e estabilidade durante o armazenamento (Santos; Silva; Garcia, 2023).

Dentre as possibilidades de produtos cárneos no mercado, a incorporação de probióticos em hambúrgueres representa uma inovação na indústria de alimentos funcionais. O conceito de carnes probióticas vem sendo estudado como uma alternativa para promover a saúde intestinal e fortalecer o sistema imunológico por meio do consumo regular de carne processada enriquecida com microrganismos benéficos (Sirini *et al.*, 2021). A viabilidade dos probióticos em hambúrgueres depende de múltiplos fatores, incluindo a resistência térmica durante o processamento térmico e o armazenamento, a interação com a matriz cárnea e a aceitação sensorial do consumidor. Métodos como a microencapsulação vêm sendo amplamente investigados como estratégias para aumentar a estabilidade dos probióticos e

garantir sua funcionalidade após a cocção (Munekata *et al.*, 2021). A formulação de hambúrgueres probióticos deve considerar fatores como textura, rendimento, estabilidade oxidativa e segurança microbiológica. Esses desafios regulatórios exigem a comprovação científica da eficácia e viabilidade dos microrganismos até o consumo (Ahmed *et al.*, 2022).

O desenvolvimento de carnes funcionais tem avançado com o uso de tecnologias como encapsulação de compostos bioativos e fermentação natural, que melhoram o valor nutricional e reduzem a necessidade de aditivos artificiais (Smaoui *et al.*, 2021). Essas abordagens possibilitam que carnes funcionem como veículos para compostos benéficos, auxiliando na prevenção de doenças metabólicas (Karwowska *et al.*, 2022). Dessa forma, carnes enriquecidas com ingredientes funcionais e produzidas de maneira sustentável representam uma alternativa para atender à crescente demanda por alimentos saudáveis, sem comprometer o sabor e a qualidade nutricional. O futuro desses produtos dependerá do equilíbrio entre inovação tecnológica e aceitação do consumidor, garantindo seu papel na promoção de uma alimentação equilibrada e preventiva.

3 OBJETIVO

3.1 Geral

Microencapsular e aplicar probióticos em alimentos cárneos do tipo hambúrguer e estudar a viabilidade probiótica a altas temperaturas de cozimento e a digestão gastrointestinal simulada *in vitro*.

3.2 Específicos

- Microencapsular probióticos pela técnica de extrusão e gelificação iônica;
- Avaliar o rendimento e eficiência do processo de microencapsulação;
- Caracterizar as microcápsulas desenvolvidas quanto à forma, tamanho e concentração;
- Aplicar probióticos microencapsulados em alimento cárneo do tipo hambúrguer;
- Estudar a viabilidade probiótica do alimento cárneo do tipo hambúrguer submetido a altas temperaturas de cozimento;
- Avaliar a viabilidade probiótica do alimento cárneo do tipo hambúrguer submetido a digestão gastrointestinal simulada *in vitro*.

4 METODOLOGIA

4.1 Microorganismo probiótico utilizado

Foi utilizado a cepa comercial do microrganismo probiótico, *L. rhamnosus* GG (DSM 33156) provinda do acervo bacteriológico do Laboratório de Tecnologia de Bioativos (LABTECBIO) da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Para a utilização, a cepa foi reativada em caldo de Man Rogosa e Sharpe (MRS) a 37°C por 24h. Também foi realizada a Coloração de Gram para a visualização no microscópio para a avaliar a pureza do inóculo probiótico.

4.2 Produção de biomassa probiótica

A produção de biomassa foi feita em Biorreator TEC-BIO-PLUS (Tecnal) acoplado em um banho termostatzado Tecnal TE-2005 e uma bomba à vácuo Tecnal TE-0521. Foram utilizados 800 mL de caldo MRS com adição de 80 mL de inóculo pré-ativado da cepa LGG ($\sim 10^{15}$ UFC/mL) e incubado por 24h a 37 °C. A manipulação deste tipo de metodologia permite a criação de um ambiente controlado para o crescimento bacteriano, seguindo determinadas condições mostradas na Tabela 1. O cultivo teve uma duração de 24h no biorreator, com retiradas de alíquotas entre 0 e 24h. Cada alíquota foi analisada em espectrofotômetro UV-Visível (595 nm).

Tabela 1 - Condições utilizadas para a produção de biomassa probiótica no Biorreator TEC-BIO-PLUS (Tecnal)

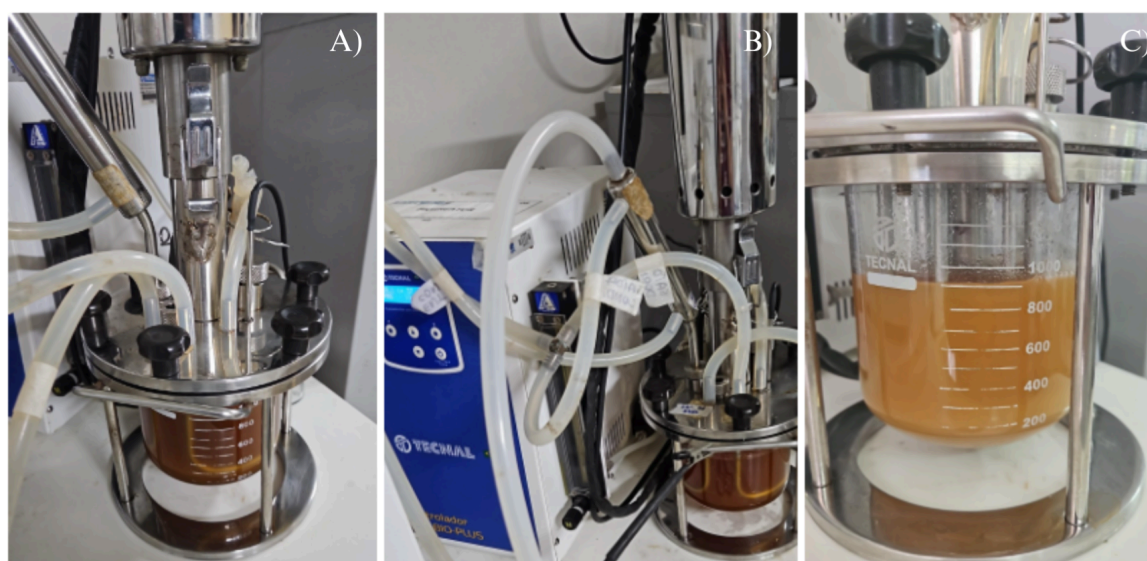
Condições	Valores
Rotação	100 rpm
Aeração	0,5 v/v/min
Temperatura	37 °C

Fonte: o autor, 2024

Decorrido o tempo de cultivo, a cultura foi centrifugada em tubos de polipropileno de 50 mL a uma rotação de 5000 rpm por 10 minutos para a obtenção do pellet bacteriano que logo após, foi ressuspendido com solução salina a 1%. A partir disso, 1 mL da amostra foi utilizado para análise no espectrofotômetro UV-Visível (595 nm). A absorbância foi definida

e logo após feita a diluição seriada e plaqueamento em superfície em ágar MRS por 37 °C a 48 horas em condições de aerobiose. Depois do tempo indicado de incubação das amostras em diferentes diluições, foram realizadas as contagens das colônias para a enumeração do probiótico em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

Figura 3 - Produção de biomassa de *L. rhamnosus* GG em Biorreator Tecnal TEC-BIO-PLUS. **a)** Dorna contendo caldo MRS acoplada no equipamento; **b)** Biorreator instalado logo após a inoculação da cepa probiótica pré-ativada no caldo MRS contido na dorna; **c)** Dorna contendo caldo e biomassa probiótica após 24h de cultivo.



Fonte: o autor, 2024.

4.3 Microencapsulação de probióticos pela técnica de extrusão e gelificação iônica

Foi desenvolvido microcápsulas a base de polímeros, sendo eles Alginato de sódio à 1% + Whey protein concentrado 1% (A1%W1%), pela técnica de extrusão e gelificação iônica, de acordo com a metodologia adaptada de He *et al.*, (2015).

A solução para as microcápsulas A1%W1% foi preparada com a dissolução de alginato a 1% m/v em água destilada estéril em constante agitação (300 rpm) por 24 horas para completa homogeneização. Da mesma forma, o whey protein concentrado foi misturado a 1% m/v com água destilada estéril e mantido, separadamente, em constante agitação (300 rpm) por 24 horas. Posteriormente, foram misturadas na proporção 1:1, mantendo-se a concentração de 1% m/v. Por fim, foi adicionada a concentração probiótica da cepa *L. rhamnosus* GG com D.O de 2.5 ($\sim 10^{15}$ UFC/mL). As soluções voltaram a agitação (300 rpm/15 min) para finalizar a homogeneização.

Para a produção das microcápsulas, foi utilizado um Encapsulador B-395 PRO (BUCHI, Brasil LTDA) (Figura 4). Esse equipamento utiliza a tecnologia de quebra do jato laminar de um fluxo de líquido em cápsulas de tamanhos iguais a partir da aplicação de frequência vibracional controlada ao líquido. A solução contendo os materiais de parede e a cepa *L. rhamnosus* GG já homogeneizada foi adicionada em seringas de 20mL estéreis e acopladas na bomba de seringa do equipamento para que o líquido pudesse ser extrudado pelo *nozzle* interno de 120 μ para o recipiente contendo a solução de recolha/polimerização, o cloreto de cálcio a 0,1M. Depois de alguns testes, a altura ideal entre o *nozzle* e o recipiente com a solução foi de 18 cm. Dessa forma, a solução foi extrudada, de modo a formar gotículas pela vibração mecânica do equipamento, dentro do CaCl₂, em constante agitação (130 rpm) para formar as microcápsulas, a uma taxa de fluxo de 3 mL/min. Outros parâmetros foram utilizados, como mostra a tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros utilizados no processo de Microencapsulação de Extrusão e Gelificação Iônica no Encapsulador B395 PRO (BUCHI, Brasil LTDA)

Parâmetros	Valores
Taxa de Fluxo	6 mL/min
Frequência	4000 Hz
Eletrodo	800 V
Amplitude	4
Altura da Queda da Gota	18 cm
Agitação da Solução Polimerizante	130 RPM

Fonte: o autor, 2024

As microcápsulas foram coletadas com peneiras estéreis para filtração de células com poros de 100 μ , lavadas em água destilada estéril e armazenadas em tubos de polipropileno também estéril de 50 mL. Por fim, as microcápsulas foram congeladas a -20 °C e em seguida

lioofilizadas para se obter as microcápsulas secas em pó.

Figura 4 - Vista frontal da unidade de controle Encapsulador B-395 PRO



Fonte: Adaptado de Manual de operação do B-395 Pro, versão E, 2024.

4.4 Avaliação do rendimento e eficiência do processo de microencapsulação

O rendimento da microencapsulação foi avaliado pelo peso seco das microcápsulas em comparação ao peso inicial da mistura e expresso em percentagem. A fórmula utilizada foi:

$$\text{RE\%} = \frac{\text{Peso final das cápsulas secas}}{\text{Volume final da solução de polimerização}} \times 100$$

A eficiência do processo de microencapsulação foi mensurada pela concentração probiótica (UFC/grama de microcápsulas) em comparação a concentração inicial que foi inoculada na mistura e expresso em percentagem. A fórmula utilizada foi:

$$EE\% = \frac{\text{Concentração inicial do probiótico} \quad (\log_{10} \text{ UFC/mL})}{\text{Concentração final do Probiótico} \quad (\log_{10} \text{ UFC/mL})} \times 100$$

Basicamente, uma alíquota de 0,01g de microcápsulas secas foi submetida a uma solução de citrato de sódio (0,1% m/v, pH 7) em agitação constante por 15 minutos, permitindo uma completa desintegração das microcápsulas e liberação do material microencapsulado, onde a amostra foi recuperada por centrifugação (5.000 rpm por 10 minutos). Para a concentração de probióticos foi realizada diluição seriada em água salina (1% m/v) e enumerado a viabilidade probiótica pelo método de plaqueamento em superfície em ágar MRS a 37 °C por 72 horas em condições de aerobiose (AOAC, 2011).

4.5 Caracterização microscópica das microcápsulas probióticas

A caracterização morfológica das microcápsulas probióticas foi realizada por microscopia óptica e eletrônica de varredura, conforme Moayyedi *et al.*, (2018).

Para a microscopia óptica, as microcápsulas úmidas foram preparadas e diluídas em solução tampão fosfato para evitar alterações estruturais e adicionadas em lâminas para, em seguida, serem analisadas por microscopia óptica. Com o auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio óptico, foi possível a medição das microcápsulas. Já para a microscopia eletrônica de varredura, as cápsulas foram fixadas em suportes metálicos e recobertas com uma fina camada de ouro para facilitar a condução elétrica.

4.6 Aplicação de probióticos microencapsulados em alimento cárneo tipo hambúrguer

O alimento cárneo comercial utilizado foi a carne de hambúrguer, onde 45 g da amostra foi processada e misturada com as microcápsulas de *L. rhamnosus* GG (5% m/v). No caso do tratamento controle, foi adicionado inóculo do probiótico (5% m/v) ressuspenso em solução salina estéril (1% m/v). Após a aplicação, os alimentos foram armazenados em um freezer a aproximadamente -20°C por 24h para melhorar a consistência.

4.7 Viabilidade probiótica do hambúrguer submetido a altas temperaturas de cozimento

O estudo da viabilidade probiótica do hambúrguer foi realizado seguindo diversas condições (Tabela 3) de temperatura para simular o cozimento em fogão.

Tabela 3 - Condições utilizados no processo de cozimento dos alimentos cárneos com as microcápsulas e célula livre

Condições	Valores
Temperatura externa (°C) do alimento	~130
Temperatura interna (°C) do alimento	~73
Tempo médio (min) de cozimento	~12

Fonte: o autor, 2024.

Figura 5 - Processo de cozimento dos alimentos cárneos. A) Medição da temperatura interna da carne de hambúrguer durante o cozimento; B) A carne após o cozimento.



Fonte: o autor, 2024.

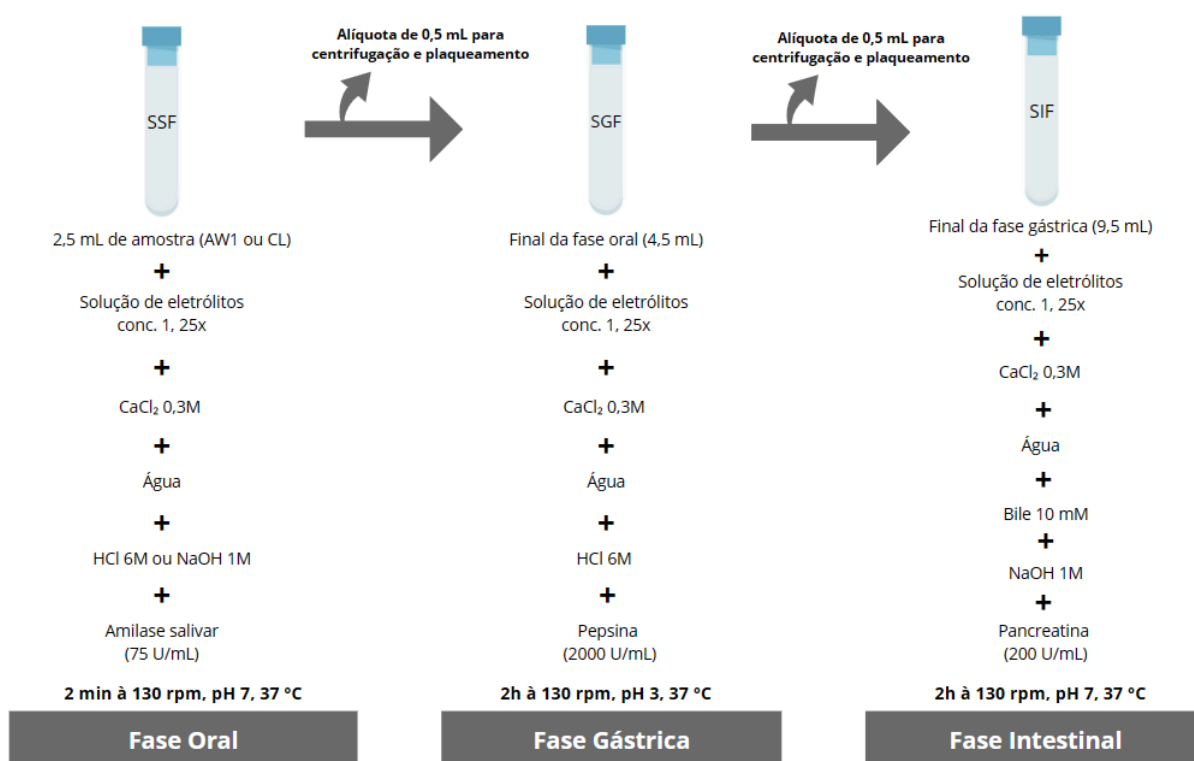
Amostras de 25g de alimento com as microcápsulas e célula livre foram submetidas a temperaturas de 100-130 °C durante o tempo de cozimento desses alimentos cárneos. Posteriormente a isso, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente e análise de viabilidade probiótica foi realizada, onde 1g de amostra com as microcápsulas foi coletada e

submetida ao processo de desintegração das microcápsulas e posterior enumeração probiótica (UFC/g) pelo método de plaqueamento (AOAC, 2011), assim como o tratamento controle, conforme já descrito.

4.8 Viabilidade probiótica do hambúrguer cozido frente a digestão gastrointestinal simulada *in vitro*

O teste de viabilidade e estabilidade das microcápsulas e das células livres aplicadas no hambúrguer na digestão gastrointestinal simulada *in vitro* foi realizado seguindo a metodologia do protocolo COST INFOGEST de Minekus *et al.*, (2014). Para mimetizar tais condições fisiológicas, o processo foi dividido em fase oral, gástrica e intestinal, incluindo parâmetros específicos empregados em cada etapa, como é mostrado na Figura 6. Primeiramente, para compor a base dos fluidos salivar, gástrico e intestinal, foi preparada a solução de eletrólitos concentrado em 1,25x baseado em dados humanos *in vivo*.

Figura 6 - Fluxograma do desenho experimental utilizado para avaliação de viabilidade e estabilidade das microcápsulas probióticas frente a digestão gastrointestinal *in vitro*.



Fonte: o autor, 2024.

Foram realizados testes em três grupos diferentes: carne de hambúrguer com o probiótico microencapsulado (A1%W1%), o controle positivo (carne de hambúrguer com

células probióticas livres) e o controle negativo (apenas a carne de hambúrguer). Em tubos de polipropileno estéril de 50 mL diferentes foram adicionados 0,1 g das amostras, todas diluídas em 2,4 mL de água Milli-Q. Posteriormente, foi adicionado aos três tratamentos, a solução de eletrólitos para a fase oral, CaCl₂ 0,3 M e completado o volume com água Milli-Q. Antes de adicionar a solução de amilase salivar diluída em água, o pH dos fluidos foi ajustado com o auxílio de um pHmetro, adicionando NaOH 1 M para atingir o pH 7, atingindo um volume de 5 mL. O experimento foi realizado em um shaker refrigerado (TE-421, TECNAL) com algumas adaptações, à 37 °C por 2 minutos e 130 rpm. Após esse processo, uma alíquota de 0,5 mL foi transferida de cada tubo para eppendorfs de 1,5 mL, onde foi centrifugada para obter a amostra sem nenhum tipo de diluição e, em seguida, foi realizado o plaqueamento para enumeração das células probióticas da A1%W1% e controle positivo.

Para a fase gástrica, foram adicionados os fluidos nos mesmos tubos com o conteúdo restante da fase oral, porém em volumes diferentes para mimetizar o suco gástrico. Antes da adição da solução de pepsina diluída em água, foi realizado o ajuste com HCl 6M para o pH 3. Os tubos foram deixados em agitação à 37 °C por 2 horas. Após esse período, o pH foi ajustado para 7 para que fosse retirada uma alíquota de 0,5 mL e realizado a quantificação das células probióticas, assim como na fase oral. Por fim, houve a fase intestinal, com o volume inicial contendo o conteúdo restante da fase gástrica, os fluidos intestinais e bile 10 mM. Anteriormente ao acréscimo da solução de pancreatina diluída em água, foi conferido o pH 7. Os tubos passaram mais 2 horas em constante agitação (130 rpm) a 37°C. Com a finalização do teste, o procedimento para a quantificação das células probióticas após a fase intestinal foi realizado da mesma forma que nas fases anteriores.

4.9 Análises estatísticas

Todos os resultados de análises foram apresentados como médias \pm desvios-padrão. As análises estatísticas foram realizadas com 95% de confiança ($p < 0,05$) com o Test T, utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad Software, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento e eficiência de encapsulação

O rendimento das microcápsulas A1%W1% foi aproximadamente 85% (Tabela 4). Já foi relatado na literatura que a quantidade de matrizes encapsulantes interfere no resultado do rendimento. Segundo o trabalho de Sun *et al.*, (2023b), que diz que quantidade iguais de dois

ou mais polímeros diminui o rendimento da microencapsulação. Além disso, a inclusão de whey protein no processo de encapsulação pode reduzir o rendimento final em gramas devido à maior absorção de umidade (Farahani *et al.*, 2024). Propuseram também que existe uma possível relação entre peso molecular de uma matriz e outra, interferindo, assim, no resultado final. A proteína do soro do leite (Whey Protein) por conter diversos peptídeos fracionados com alto peso molecular, como a albumina do soro bovino que representa cerca de 10% da composição (Haraguchi *et al.*, 2006), pode ter tido influência significativa.

Para a eficiência de microencapsulação A1%W1% (Alginato de sódio 1% e Whey protein concentrado 1%), foi utilizado inóculo de *L. rhamnosus* GG com uma D.O de 2,5 Abs (595nm), que após plaqueamento e contagem, correspondeu a 10^{15} UFC/mL. Seguindo a metodologia, após o processo de microencapsulação, as microcápsulas A1%W1% apresentaram uma concentração aproximada de 10^{14} UFC/mL (tabela 4), alcançando uma eficiência de microencapsulação superior a 90%. Esses resultados estão de acordo com o que foi demonstrado por Hinnenkamp *et al.* (2021). Os trabalhos compararam a eficiência de encapsulação entre cápsulas com as mesmas composições de A1%W1% e com outros tipos de polímeros, e constataram que a adição de whey protein aumenta a eficiência de encapsulação significativamente, já que este biopolímero contribui para uma maior densidade estrutural das cápsulas. O tipo de técnica de encapsulação também está relacionada a uma elevada eficiência de encapsulação, já que a utilização da tecnologias que não emprega temperaturas altas e não provoca estresse osmótico como método microencapsulante, reduz a perda de células probióticas (Pupa *et al.*, 2021). Além disso, a adição de pelo menos dois agentes microencapsulantes auxilia diretamente na eficiência de encapsulação, potencializando o efeito protetor ao microrganismo probiótico preso nas microcápsulas (Doherty *et al.*, 2011).

Tabela 4 - Rendimento (RE) e Eficiência (EE) de microencapsulação das microcápsulas probióticas A1%W1% (Alginato de sódio 1% + Whey protein 1%)

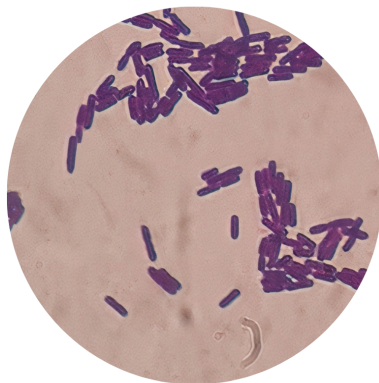
Composição	RE (%)	EF (%)
Cápsula A1%W1%	87,3 ± 3,7	90,6 ± 1,9

Fonte: o autor, 2024

5.2 Caracterização da morfologia da cepa de *L. rhamnosus* e das Microcápsulas secas e úmidas por Microscopia óptica e Microscopia eletrônica de varredura

Para a caracterização morfológica da *L. rhamnosus* foi realizada a técnica de coloração de Gram que utiliza a composição e as propriedades da parede celular das bactérias para diferenciá-las. Como observado na Figura 7, a cepa de *L. rhamnosus* tem a morfologia de bacilos alongados, apresentando coloração azul, características de bactérias Gram Positivas, o que vai de acordo com vários trabalhos, como o de Albarillo *et al.* (2020). Essas análises foram importantes para confirmar a cepa probiótica e a pureza do inóculo.

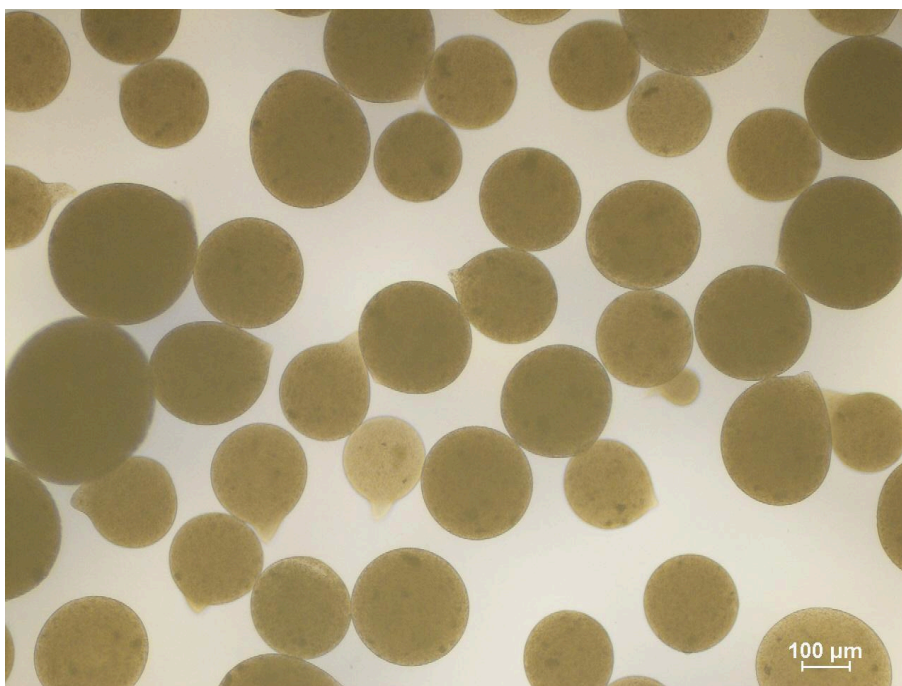
Figura 7 - Caracterização morfológica da cepa probiótica *L. rhamnosus* GG.



Fonte: o autor, 2024.

A morfologia das cápsulas úmidas (Figura 8) apresentou um formato esférico, com pequenas regiões mais alongadas, o que é comum na técnica de extrusão. Isso ocorre porque a morfologia das cápsulas irá depender do tamanho e formato do objeto em que a solução é extraída durante a técnica de extrusão (Mahmoud *et al.*, 2020). As microcápsulas obtiveram um tamanho médio de 120 μm .

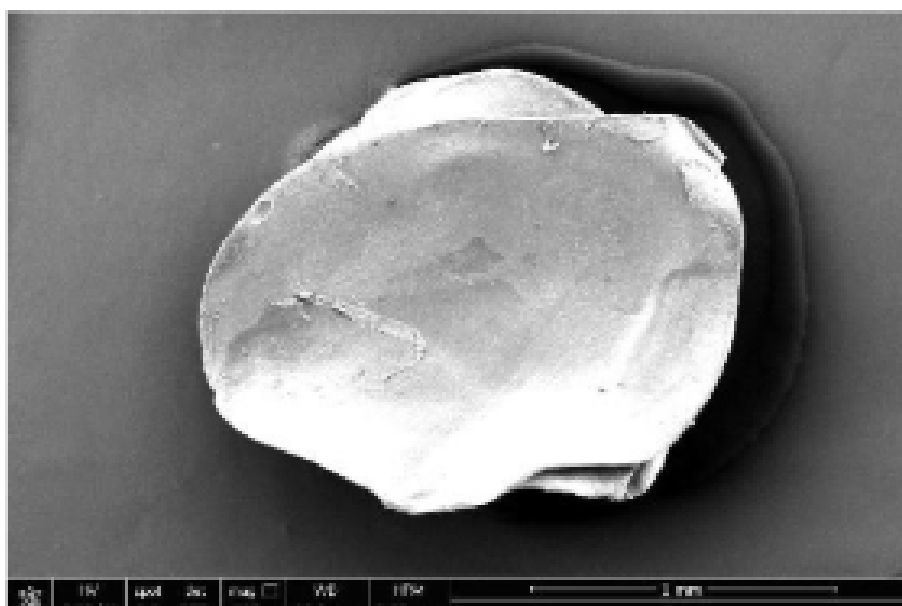
Figura 8 - Caracterização da morfologia das microcápsulas úmidas por microscopia óptica (objetiva de 5x) e fotografia padrão.



Fonte: o autor, 2024.

A morfologia das microcápsulas A1%W1% secas (liofilizadas) foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (Figura 9).

Figura 9 - Caracterização da morfologia das microcápsulas A1%W1% secas por microscopia eletrônica de varredura com um aumento de 100x.



Fonte: o autor, 2024.

Na figura 9, temos um aumento de 100x da microcápsula seca, onde percebemos a forma esférica, porém achatada devido a pressão do vácuo no processo de liofilização, além

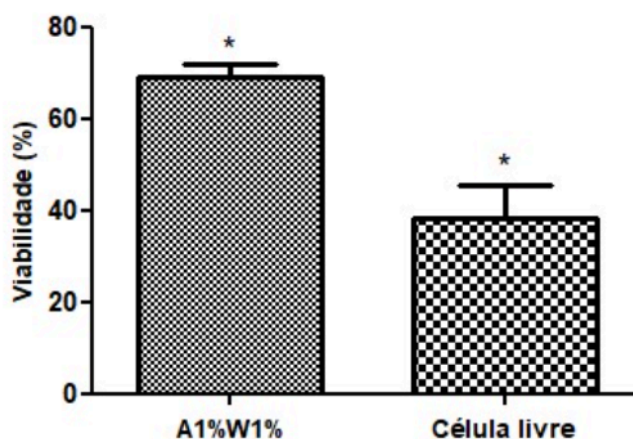
de algumas elevações e poros na parede. Fareez *et al.*, (2015) considerou que essas irregularidades na superfície são devido a uma alta concentração de polímeros. Essas alterações, como fissuras e poros, nas cápsulas liofilizadas também é relatado em trabalhos como o de Chen; Li; Liu; Meng (2017), Etchepare *et al.*, (2020) e de Sun *et al.*, (2022).

5.3 Viabilidade probiótica do alimento cárneo submetido a altas temperaturas de cozimento

O alimento cárneo hambúrguer juntamente com o probiótico *L. rhamnosus* GG, tanto em sua forma livre quanto microencapsulada, foram submetidos às temperaturas de cozimentos no fogão a temperaturas de 100-130 °C e foi conferido também a temperatura interna do alimento que chegou a 73 °C. O processo de cozimento durou cerca de 12 minutos. Os resultados foram transformados de Log10 UFC/g para a porcentagem de células viáveis.

Os resultados obtidos (figura 10) mostraram que o probiótico *L. rhamnosus* GG é significativamente ($P < 0,05$) mais resistente ao estresse térmico quando aplicados no alimento cárneo dentro das microcápsulas, em comparação com as células livres, alcançando aproximadamente 70% de viabilidade durante o final do processo de cozimento. E as células livres apresentando 38,3 % de viabilidade sob o mesmo estresse térmico. É visto na literatura que a microencapsulação melhora a resistência térmica dos probióticos durante o processamento de alimentos, protegendo-os contra temperaturas elevadas e garantindo maior viabilidade celular (Manco *et al.*, 2023). Isso foi visto no estudo de Penhasi, Reuveni e Baluashvili (2021), onde foi aplicado a cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* microencapsulada durante o processo de panificação a 180°C por 40 minutos. As células livres sofreram uma grande redução na viabilidade. Isso pode ser explicado pela proteção trazida pelos polímeros utilizados nas microcápsulas. Esses polímeros atuam como uma camada protetora para os probióticos, o que reduz a exposição direta ao calor e minimiza a desnaturação das proteínas e a destruição das membranas celulares (Yao *et al.*, 2020). A *L. rhamnosus* GG possui também outros mecanismos que possibilitam sua sobrevivência aos estresses térmicos, como modulação da membrana celular apresentando redução de danos e maior tolerância ao calor (Ananta & Knorr, 2009) e 33 adaptações genéticas (Aakko *et al.*, 2014)

Figura 10 - Viabilidade probiótica das microcápsulas A1%W1% e Célula livre incorporado no alimento cárneo hambúrguer e submetido a altas temperaturas de cozimento



* foram significativamente diferentes ($P < 0,05$), Test T.

Fonte: o autor, 2024.

5.4 Estudo da viabilidade e estabilidade das microcápsulas probióticas aplicadas em alimento cárneo frente a digestão gastrointestinal simulada *in vitro* após o cozimento

As células livres (controle positivo) e microencapsuladas (A1%W1%) de *L. rhamnosus* GG aplicadas em alimento cárneo foram submetidas ao teste de simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*, posteriormente ao seu cozimento. Os resultados obtidos sobre a viabilidade das amostras submetidas aos tratamentos foram transformados de UFC/g para Log10 UFC/g e para % de células viáveis para cada fase, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5 - Viabilidade probiótica das microcápsulas (A1%W1%) e das células livres aplicadas na carne de hambúrguer após a simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*

Composição	Oral %	Gástrica %	Intestinal %
Carne de hambúrguer com as cápsulas A1%W1%	97,5 ± 1,2*	87,6 ± 1,5*	76,4 ± 6,0*
Carne de hambúrguer com <i>L. rhamnosus</i> GG (Célula livre)	87,1 ± 0,1*	0 ± 0,0*	0 ± 0,0*

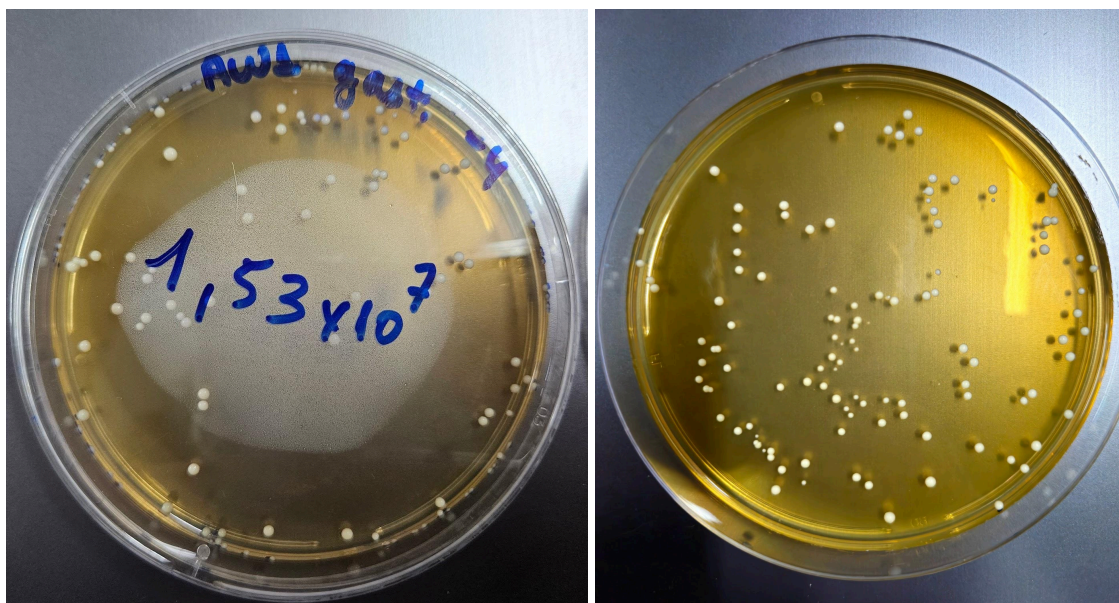
* foram significativamente diferentes ($P < 0,05$), Test T.

Fonte: o autor, 2025.

A partir dos resultados, a microencapsulação do probiótico se mostrou significativamente ($P < 0,05$) eficaz no processo de proteção contra as condições adversas

encontradas na digestão. As células livres apresentaram 87% de viabilidade celular na fase oral, porém não apresentaram nenhuma viabilidade nas outras fases. As microcápsulas A1%W1% demonstraram resultados superiores, com cerca de 76,4% na fase final (intestinal).

Figura 11 - Contagem da concentração de *L. rhamnosus* GG encapsulada e aplicada na carne de hambúrguer após a digestão em placa de petri com meio MRS ágar.



Fonte: o autor, 2025.

A diminuição para concentrações mínimas durante condições semelhantes à gástrica foi também observado em *Lactobacillus acidophilus* (Afzaal *et al.*, 2020). A rápida redução da viabilidade nas células livres diferentemente do que ocorreu nas células microencapsuladas também já é encontrado na literatura, onde a adição de Whey Protein juntamente com o Alginato confere alta proteção às células probióticas durante várias condições de estresse, inclusive durante a digestão gastrointestinal (Han *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2023; Vanden Braber *et al.*, 2020). Isso acontece devido a formação de uma matriz alginato-proteínas graças a cargas diferentes presentes nesses compostos. Já foi verificado que, sob o ponto isoelétrico (característica dependente de pH), proteínas carregadas positivamente interagem com alginato carregado negativamente, formando um complexo. Devido à natureza diferente das proteínas e à possibilidade de reticulação com alginato de sódio em diferentes valores de pH, pode-se concluir que o complexo alginato-whey protein é sensível ao pH, o que pode aumentar a proteção dos probióticos contra condições estressantes, especialmente no suco gástrico (Wang *et al.*, 2022).

6 CONCLUSÃO

Pelos resultados apresentados, a microencapsulação se mostrou um método eficaz na proteção do probiótico *L. rhamnosus* GG contra a exposição a altas temperaturas em razão do cozimento do alimento cárneo hambúrguer e da digestão gastrointestinal. As células livres mostraram pouca resistência às condições presentes de altas temperaturas, como também na fase gástrica e intestinal. Enquanto as células microencapsuladas com alginato a 1% e whey protein a 1% apresentaram maior viabilidade e estabilidade durante o estudo. Isso indica que composições de cápsulas com alginato e whey protein são eficientes para a proteção de probiótico durante o estresse térmico que ocorre durante o cozimento e a passagem pelo trato gastrointestinal. A aplicação de probióticos microencapsulados em alimentos cárneos é uma inovação promissora para alimentos funcionais. Apesar de amplamente estudada em laticínios, ainda há desafios quanto à resistência térmica e viabilidade em matrizes cárneas. Avanços na área podem diversificar produtos e melhorar seu valor nutricional, com métodos de encapsulamento sendo a estratégia-chave.

REFERÊNCIAS

- AFZAAL, M. et al. Survival and storage stability of encapsulated probiotic under simulated digestion conditions and on dried apple snacks. *Food Science & Nutrition*, v. 8, n. 10, p. 5392–5401, 2020.
- A.O.A.C. – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18. ed. Maryland: AOAC International, 2011.
- ALBARILLO, F. S. et al. Lactobacillus rhamnosus infection: A single-center 4-year descriptive analysis. *Journal of Global Infectious Diseases*, v. 12, p. 119-123, 2020.
- BERTUCI, M. et al. Bio preservation capacity of potentially probiotic Lacticaseibacillus strains in fermented sausage. *International Journal of Food Science & Technology*, 2023.
- BHARDWAJ, S. et al. Microencapsulation: an updated review article. *International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis*, p. 1–7, 2024.
- BOONMA, P. et al. Draft genome sequences and description of Lactobacillus rhamnosus strains L31, L34, and L35. *Standards in Genomic Sciences*, v. 9, n. 3, p. 744–754, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 398 de 30 de abril de 1999. Diretrizes para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 03 de maio de 1999.
- CABELLO-OLMO, M. et al. Influence of storage temperature and packaging on bacteria and yeast viability in a plant-based fermented food. *Foods (Basel, Switzerland)*, v. 9, n. 3, p. 302, 2020.
- CHEN, H.-Y. et al. Microencapsulation of Lactobacillus bulgaricus and survival assays under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, v. 29, p. 248–255, 2017.
- COHEN, G. et al. Sucrose Concentration and Fermentation Temperature Impact the Sensory Characteristics and Liking of Kombucha. *Foods*, v. 12, 2023.
- DE ARAÚJO ETCHEPARE, M. et al. Improvement of the viability of encapsulated probiotics using whey proteins. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie [Food Science and Technology]*, v. 117, n. 108601, p. 108601, 2020.
- DOHERTY, S. B. et al. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocolloids*, v. 25, n. 6, p. 1604–1617, 2011.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: Report of a joint FAO/WHO Working Group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Ontario, Canada, 2002.

FAREEZ, I. M. et al. Chitosan coated alginate-xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 72, p. 1419–1428, 2015.

FIJAN, S.; HAAR, J. A. T.; VARGA, L. Probiotic Microorganisms and Their Benefit to Human Health. *Advances in Probiotics*, 2021.

GODERSKA, K.; AGUDO PENA, S. An in vitro gastrointestinal model to evaluate the tolerance of encapsulated *Lactobacillus* and *Lactococcus* strains with synbiotic containing lactobionic acid via lyophilization technique to harsh gastric conditions during storage time. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2023.

HAN, J. et al. Oral delivery of probiotics using single-cell encapsulation. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, v. 23, n. 3, p. e13322, 2024.

HAN, C.; XIAO, Y.; LIU, E.; SU, Z.; MENG, X.; LIU, B. Preparation of Ca-alginate-whey protein isolate microcapsules for protection and delivery of *L. bulgaricus* and *L. paracasei*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C. DE; PAULA, H. DE. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Revista de Nutrição*, v. 19, n. 4, p. 479–488, 2006.

HE, Y. et al. Encapsulation and characterization of slow-release microbial fertilizer from the composites of bentonite and alginate. *Applied Clay Science*, v. 109–110, p. 68–75, 2015.

HILL, C. et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic: Expert consensus document. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

HINNENKAMP, C.; REINECCIUS, G.; ISMAIL, B. P. Efficient encapsulation of fish oil: Capitalizing on the unique inherent characteristics of whey cream and hydrolyzed whey protein. *Journal of dairy science*, v. 104, n. 6, p. 6472–6486, 2021.

JONATHAN, I. et al. Effects of Temperature Shock on Viability and Stress-Related Gene Expression in *Pediococcus acidilactici*, a Probiotic Lactic Acid Bacteria. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, v. 1255, 2023.

KARWOWSKA, M. et al. Functional and clean label dry fermented meat products: Phytochemicals, bioactive peptides, and conjugated linoleic acid. *Applied sciences (Basel, Switzerland)*, v. 12, n. 11, p. 5559, 2022.

KHAIRANI, M.; ANGGRAINI T.; AZIMA, F. Research Trends and Applications of Spray Drying Technology in Probiotics: Bibliometric Analysis. *International Journal of Research and Scientific Innovation*, 2024.

LIU, Q. et al. Improved viability of probiotics via microencapsulation in whey-protein-isolate-octenyl-succinic-anhydride-starch-complex coacervates. *Molecules*, v. 28, 2023.

LUCA, L.; OROIAN, M. Influence of Different Prebiotics on Viability of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* Encapsulated in Alginate Microcapsules. *Foods (Basel, Switzerland)*, v. 10, n. 4, p. 710, 2021.

MALMO, C.; GIORDANO, I.; MAURIELLO, G. Effect of microencapsulation on survival at simulated gastrointestinal conditions and heat treatment of a non-probiotic strain, *Lactiplantibacillus plantarum* 48M, and the probiotic strain *Limosilactobacillus reuteri* DSM 17938. *Foods*, v. 10, 2021.

MAHMOUD, M. et al. Survivability of alginate-microencapsulated *Lactobacillus plantarum* during storage, simulated food processing and gastrointestinal conditions. *Heliyon*, v. 6, n. 3, p. e03541, 2020.

MAO, J. et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation and barrier dysfunction by regulating MAPK/NF- κ B signaling and modulating metabolome in the piglet intestine. *The journal of nutrition*, v. 150, n. 5, p. 1313–1323, 2020.

MANCO, J. C. A.; RENDON, M. A.; ZAPATA, M.; ROITER, T.; RUIZ, J. N.; VELASQUEZ, J. M. U. Microencapsulated *Lactobacillus* Powder: An Approach to Produce Probiotics Resistant to Different Stress Conditions. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 2023.

MINEKUS, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function*, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.

- MOAYYEDI, M. et al. Effect of drying methods (electrospraying, freeze drying and spray drying) on survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *Journal of Functional Foods*, v. 40, p. 391–399, 2018.
- NAZZARO, F. Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, n. 23, p. 182–186, 2012.
- PENHASI, A.; REUVENI, A.; BALUASHVILI, I. Microencapsulation may preserve the viability of probiotic bacteria during a baking process and digestion: A case study with *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* in bread. *Current microbiology*, v. 78, n. 2, p. 576–589, 2021.
- POURJAFAR, H. et al. Viability of microencapsulated and non-microencapsulated lactobacilli in a commercial beverage. *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)*, v. 25, n. e00432, p. e00432, 2020.
- PUPA, P. et al. The efficacy of three double-microencapsulation methods for preservation of probiotic bacteria. *Scientific Reports*, v. 11, n. 13753, 2021.
- SAHA, S. et al. Recent advances in the use of probiotics to improve meat quality of small ruminants: A review. *Microorganisms*, v. 11, n. 7, p. 1652, 2023.
- SANTOS, M.; SILVA, J.; GARCIA, P. Application of dietary fiber in meat products: effects on technological and sensory properties. *Food Research International*, 2023.
- SILVA, S. et al. Microencapsulation of Probiotics by Oil-in-Water Emulsification Technique Improves Cell Viability under Different Storage Conditions. *Foods*, 2023.
- SIRINI, N. et al. Use of probiotic microorganisms in the formulation of healthy meat products. *Current opinion in food science*, v. 38, p. 141–146, 2021.
- SMAOUI, S. et al. Recent advancements in encapsulation of bioactive compounds as a promising technique for meat preservation. *Meat science*, v. 181, n. 108585, p. 108585, 2021.
- STABRAUSKIENE, J.; PUDZIUVELYTE, L.; BERNATONIENE, J. Optimizing encapsulation: Comparative analysis of spray-drying and freeze-drying for sustainable recovery of bioactive compounds from *Citrus x paradisi* L. peels. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, v. 17, n. 5, p. 596, 2024.

STAGE STRICKERTSSON, M. et al. Genomic stability and phenotypic characteristics of industrially produced *Lactobacillus rhamnosus* GG in a yogurt matrix. *Applied and environmental microbiology*, v. 87, n. 24, p. e0157521, 2021.

SUN, W. et al. Microencapsulation and application of probiotic bacteria *Lactiplantibacillus plantarum* 299v strain. *Microorganisms*, v. 11, n. 4, 2023.

SUN, W. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* 299v Strain with Whey Proteins by Lyophilization and Its Application in Production of Probiotic Apple Juices. *Applied Sciences*, 2023b.

STAVROPOULOU, E.; BEZIRTZOGLU, E. Probiotics in Medicine: A Long Debate. *Frontiers in Immunology*, v. 11, 2020.

TYTGAT, H. L. P. et al. Selection and characterization of a SpaCBA pilus-secreting food-grade derivative of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 105, n. 3, p. 1123–1131, 2021.

VANDEN BRABER, N. et al. Effect of microencapsulation in whey protein and water-soluble chitosan derivative on the viability of the probiotic *Kluyveromyces marxianus* VM004 during storage and in simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*, v. 118, 2020.

VELÁZQUEZ-GUTIÉRREZ, S. K. et al. Ionic gelation encapsulation of sesame oil with sodium alginate-nopal mucilage blends: Encapsulation efficiency and oxidative stability. *Revista mexicana de ingeniería química*, v. 19, n. 1, p. 349–362, 2020.

YAO, M. et al. Progress in microencapsulation of probiotics: A review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, v. 19, n. 2, p. 857–874, 2020.

YASMIN, I. et al. Development of whey protein concentrate-pectin-alginate based delivery system to improve survival of *B. longum* BL-05 in simulated gastrointestinal conditions. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 11, n. 2, p. 413–426, 2019.

WANG, X. et al. Microencapsulating alginate-based polymers for probiotics delivery systems and their application. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, v. 15, n. 5, p. 644, 2022.

ZAHRA, S. Application of carrot waste extract and *Lactobacillus plantarum* in *Alyssum homalocarpum* seed gum-alginate beads to create a functional synbiotic yogurt. *Elsevier, Irã*, v. 10, n. 1, dez. 2023.

