UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

APLICAÇÃO DE *LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM* Lp-115, *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* Spp. *LACTIS* Bb-12 E *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* La-5 EM HAMBÚRGUER

ANNECLER RECH DE MARINS

Maringá

2020

ANNECLER RECH DE MARINS

APLICAÇÃO DE *LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM* Lp-115, *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* Spp. *LACTIS* Bb-12 E *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* La-5 EM HAMBÚRGUER

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Maringá

2020

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

M339a

Marins, Annecler Rech de

Aplicação de *Lactiplantibacillus plantarum* lp-115, *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* bb-12 e *Lactobacillus acidophilus* la-5 em Hambúrguer / Annecler Rech de Marins. -- Maringá, PR, 2020.

49 f.: il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Andresa Carla Feihrmann.

Coorientadora: Profa. Dra. Raquel Guttierres Gomes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciências Agronômicas, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2020.

1. Probióticos - Hambúrguer - Produção. 2. Produtos cárneos funcionais. 3. Digestão *in vitro*. I. Feihrmann, Andresa Carla, orient. II. Gomes, Raquel Guttierres, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Ciências Agronômicas. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDD 23.ed. 664.9

Elaine Cristina Soares Lira - CRB-9/1202

ANNECLER RECH DE MARINS

"Aplicação de *Lactiplantibacillus plantarum* Lp 115, *Bifidobacterium animalis* spp. Lactis Bb-12 e *Lactobacillus acidophilus* La-5 em hambúrguer".

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, para obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

Profa. Dra. Adriana Lourenço Soares

Prof. Dr. Antônio Roberto Gimboni Monteiro

Profa. Dra. Raquel Guttierres Gomes

Profa. Dra. Andresa Carla Feihrmann
Orientadora

Maringá - 2021

Orientadora

Andresa Carla Feihrmann

Co-orientadora

Raquel Guttierres Gomes

BIOGRAFIA

Annecler Rech de Marins nasceu em 13 de setembro de 1993 na cidade de Francisco Beltrão – PR. Possui graduação em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Ponta Grossa. Tem experiência nas áreas de Gestão de Pessoas, Controle de Qualidade, Inovação e Tecnologia de Alimentos atuando principalmente no seguinte tema: Carnes.

Dedico

A Deus, em primeiro lugar na minha vida, por permitir essa conquista. Ao meu companheiro Cleverson pelo amor e paciência. Por me inspirar a ser cada dia uma pessoa melhor.
Aos meus pais Lourdes e Tertuliano pelos ensinamentos, pelo apoio, pelas oportunidades e por serem meus maiores exemplos.
As minhas irmãs Aracéli e Thalissa pelo auxílio, amor e compreensão.
A minha família por ser minha base forte.
As minhas amigas Pâmela e Bruna pela amizade e apoio.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Dr.ª Andresa Carla Feihrmann, pela orientação, dedicação, por ter compartilhado seus conhecimentos, por acreditar nesse trabalho e tornar possível sua concretização.

À minha co-orientadora, Professora Dr.ª Raquel Guttierres Gomes, pelo apoio, auxílio, conhecimentos passados e disponibilidade em ajudar sempre.

À Universidade Estadual de Maringá, juntamente com todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos e demais colaboradores, pelo auxílio e por compartilharem seus conhecimentos.

Ao PPC (Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos) e toda sua estrutura, por me possibilitarem ingressar nessa pós-graduação.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo fomento e pelo investimento em mim e nessa pesquisa.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente estiveram contribuindo para que tudo isso fosse possível.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado está apresentada na forma de um artigo científico:

APLICAÇÃO DE *LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM* Lp-115, *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* Spp. *LACTIS* Bb-12 E *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* La-5 EM HAMBÚRGUER

Annecler Rech de Marins, Talita Aparecida Ferreira de Campos, Andreia Farias Pereira Batista, Vanesa Gesser Correa, Rosane Marina Peralta, Jane Martha Graton Mikcha, Raquel Guttierres Gomes, Andresa Carla Feihrmann.

Submetido á Meat Science, Qualis A1, Impact Factor: 3.644.

RESUMO GERAL

Introdução

Os consumidores acreditam que a saúde está diretamente relacionada com a alimentação, assim o interesse por alimentos funcionais, que auxiliam na prevenção de doenças, é considerado uma oportunidade para a indústria melhorar a qualidade dos produtos cárneos. Atualmente a aplicação de probióticos na elaboração de produtos cárneos fermentadas se tornou uma alternativa no desenvolvimento de produtos saudáveis, uma vez que os probióticos são considerados microrganismos vivos que conferem benefícios ao hospedeiro, quando administrados em quantidades adequadas de 10^6 UFC/g.

Os benefícios das cepas probióticas são muitos, podem atuar beneficamente aos intolerantes a lactose, alergias, infecção do trato respiratório, envelhecimento, modulação do sistema imunológico, entre outros. A espécie *Bifidobacterium animalis* um bacilo gram-positivo, anaeróbico e não formador de esporos, enquanto *Lactiplantibacillus plantarum* se destaca devido a sua capacidade de adaptação, além da capacidade de produzir várias e potentes bacteriocinas e *Lactobacillus acidophilus* se destaca pela capacidade de sobreviver a condições consideradas adversas no trato gastrointestinal.

Diversos estudos já realizaram a incorporação de cepas probióticas em matrizes cárneas fermentadas, porém sua incorporação depende de diversos fatores como, por exemplo, a composição do produto e se o mesmo passa por tratamento térmico, o que é considerado um desafio uma vez que as bactérias probióticas são sensíveis ao calor. Assim, o encapsulamento pode ser uma alternativa para imobilizar ou aprisionar o microrganismo protegendo suas células, evitando a perda de viabilidade e possibilitando a aplicação em diversos produtos.

Objetivos

O objetivo desse estudo foi a produção de hambúrgueres com adição dos probióticos *Bifidobacterium animalis ssp. Lactis* Bb-12®, *Lactiplantibacillus plantarum* Lp-115® e *Lactobacillus acidophilus* LA-5® encapsulados, avaliando as propriedades físico-químicas, microbiológicas, viabilidade dos probióticos nos produtos crus e cozidos e após a simulação da digestão gastrointestinal, congelados a –18 °C por 60 dias.

Material e métodos

Este trabalho iniciou-se com a produção das microcápsulas, as bactérias probióticas *Bifidobacterium animalis ssp. Lactis*, *Lactiplantibacillus plantarum* e *Lactobacillus acidophilus* foram utilizadas individualmente e adicionas a solução encapsulante, a microencapsulação foi realizada em mini spray dryer (MSD 1.0 Labmaq, São Paulo, Brasil). Para a produção dos hambúrgueres, foi utilizado 80% de carne bovina e 20% de toucinho suíno moído. A carne foi adicionada ás cepas probióticas, com contagem inicial de 7 log UFC.g^{-1}, e então os hambúrgueres foram moldados. Foram desenvolvidos 5 tratamentos sendo a formulação controle (C) sem probióticos, B com *Bifidobacterium animalis ssp. Lactis*, P com *Lactiplantibacillus plantarum*, A com *Lactobacillus acidophilus* e BPA com a mistura dos três probióticos. Por fim os hambúrgueres foram embalados a vácuo e armazenados em temperatura de congelamento (- 18ºC) por 60 dias para as análises posteriores. Em seguida foram analisados a umidade, teor de proteína e o teor de cinzas dos tratamentos de acordo com AOAC (2005). O teor de lipídios foi determinado utilizando a metodologia de Bligh e

Dyer (1959). O pH foi obtido com phmetro digital portátil (Hanna, HI-99163, Romania). A determinação de atividade de água (A_w) foi realizada por leitura direta em AquaLab 4TEV (Meter Group, USA). Sendo as análises anteriores realizadas nos dias 0, 30, e 60 em triplicata, nos hambúrgueres crus e assados. As análises das substâncias reativas ao ácido 2 tiobarbitúrico (TBA) foram realizadas de acordo com metodologia descrita por Wang et. al. (2002). A análise de perfil de textura (TPA) foi realizada nos hambúrgueres assados, segundo metodologia de Bourne (1978) e os parâmetros tecnológicos foram obtidos através da pesagem e medição dos hambúrgueres crus, e após o cozimento, foi aguardado o resfriamento até temperatura ambiente (25 °C) e então os produtos foram pesados e medidos novamente, no dia 60 de armazenamento. A cor das amostras foi medida usando colorímetro (Konica Minolta, CR- 400, Japão), previamente calibrado em uma placa branca. Foram medidos três parâmetros: L* (luminosidade), a* (intensidade de vermelho) e b* (intensidade de amarelo) em três locais diferentes das amostras. As análises microbiológicas foram realizadas nos dias 0, 30 e 60 de armazenamento. A contagem de coliformes a 45 °C, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* coagulase positiva e Clostrídios sulfito redutores foram realizadas de acordo com BRASIL (2003). A viabilidade dos microrganismos probióticos presentes nas amostras foi realizada a partir de diluições decimais seriadas, seguida de inoculações por profundidade em meio seletivo específico, nos dias 0, 15, 30 e 60. A digestão gastrointestinal *in vitro* foi simulada de acordo com Correa et al. (2017). Os dados foram submetidos à análise descritiva, análise de variância e teste Tukey, a 5% de significância, onde os diferentes tratamentos e os períodos de armazenamento foram considerados efeitos fixos, com auxílio do software R versão 1.2.5019 (R Core Team, 2016).

Resultados e discussão

A umidade dos produtos crus não foi influenciada pela aplicação dos probióticos, não havendo diferença significativa entre as formulações ($P > 0.05$), no entanto nos produtos cozidos houve redução de umidade, sendo que foi observada diferença significativa ($P < 0.01$) entre a formulação BPA (58.6%), e as formulações B (52.8%), P (52.6%), A (53.8%). Como esperado, com a diminuição da umidade após o cozimento, os valores de proteínas, cinzas e lipídios apresentaram um aumento. O conteúdo de proteína nos produtos crus variou de 19.8% a 22.2%, não apresentando diferença significativa entre as formulações ($P > 0.05$), assim como o teor de cinzas. Houve diferença significativa nos valores de pH ($P < 0.05$) nas amostras cruas e cozidas, na última foi verificado um aumento do pH no dia 30 para todas as formulações ($P < 0.05$), seguido de uma queda no final do armazenamento ($P < 0.05$). Segundo alguns autores, essa diminuição do pH durante o armazenamento dos produtos cárneos é atribuída a produção de ácido láctico pelas bactérias lácticas, porém como nesse estudo os probióticos estavam encapsulados, é possível que outras bactérias lácticas presentes naturalmente na carne podem ter provocado esse efeito. Nesse estudo, os valores de A_w variaram de 0,97 a 0,99 para os hambúrgueres crus, enquanto para os produtos cozidos esses valores foram de 0,96 até 0,99. Houve diferença significativa ($P < 0.05$) nos valores de TBARS das amostras de hambúrgueres em relação ao controle. Nesse sentido, as formulações cruas A e P durante o armazenamento foram as que apresentaram os maiores valores médios, 0,18 e 0,13 mg malonaldeído/kg, respectivamente, em relação ao controle. Após o cozimento, não houve diferença significativa ($P > 0.05$) entre os tratamentos com probióticos e o controle até o dia 30 de armazenamento congelado. Entretanto, no dia 60 todos os tratamentos apresentaram aumento nos valores de TBARS e foram diferentes de C ($P < 0.05$), apesar da oxidação

lipídica ser reação dependente das temperaturas o congelamento não é necessariamente suficiente para evitar a ocorrência de oxidação, apesar disso, os valores estão dentro do valor aceitável para o consumo. Em geral, os produtos apresentaram uma perda de peso pequena, apresentando diferença estatística ($P < 0.001$) entre todos os tratamentos, variando de 17.93 a 24.26%. Houve diferença significativa nos valores de redução de diâmetro em relação ao controle ($P < 0.05$), com exceção de BPA. Os valores de dureza variaram em média de 22.21 a 40.18 N, a adição de *Lb. plantarum* ao hambúrguer diminuiu os valores do parâmetro dureza (22.21 N) diferindo estaticamente ($P < 0.001$) de todas as outras formulações. É possível que possa ter ocorrido liberação do *Lb. plantarum* presente na amostra P e este produzido uma pequena quantidade de ácidos que agiram numa menor dureza. A formulação P apresentou os menores valores médios de coesividade, elasticidade e mastigabilidade, 0,30, 0,57 e 3,91, respectivamente. O parâmetro Luminosidade (L*) não apresentou diferença significativa (no dia 30) entre as formulações em relação ao controle ($P > 0.05$) e aos 60 dias todas as formulações apresentaram uma diminuição na luminosidade em relação ao dia 0, com exceção de BPA. Como esperado, nos produtos cozidos houve uma redução da luminosidade possivelmente resultante da reação não enzimática durante o processo de cozimento. Os valores de a* das amostras cruas não apresentaram diferença no dia 0 independente do probiótico utilizado ($P > 0.05$). A respeito dos valores de b* no geral as amostras cozidas mostraram valores maiores (~19,87) do que os crus (~11,25). Enquanto os valores de h* variaram de 24.64º a 69.50º nas formulações cruas e cozidas, respectivamente, sendo a variação de cor do vermelho ao laranja-avermelhado. Os resultados das análises microbiológicas mostraram ausência de *Salmonella* spp. Para *Staphylococcus aureus* coagulase positiva e clostrídios sulfito redutores foram obtidas contagens abaixo de 2 log UFC/g e para coliformes termotolerantes a 45 ºC as contagens foram abaixo de 3.0 NMP/g. Com relação a viabilidade, no início do armazenamento é possível verificar que as contagens de BB-12 (produto cru) variaram em média de 8.44 UFC log. g^{-1} na formulação BPA e 10.03 UFC log. g^{-1} na formulação B, sendo que no final do armazenamento ambos os tratamentos apresentaram valores acima de 8 UFC log. g^{-1}. As contagens de *Lb. plantarum* foram maiores ($P <0.05$) na formulação BPA nos dias 0, 15 e 30, enquanto no dia 60 o tratamento P apresentou valor de *Lb. plantarum* de 9.75 UFC log. g^{-1} ($P < 0.05$). A contagem de *L. acidophilus* foi possível verificar que A apresentou maior viabilidade ($P <0.05$) no final do período de armazenamento (60 dias). Todas as formulações apresentaram contagens acima de 7 UFC log. g^{-1} no produto cozido. Considerando que o consumo de hambúrguer é realizado após o processamento térmico, os hambúrgueres do presente estudo podem ser considerados produtos potencialmente probióticos. Após a passagem pelo trato gastrointestinal verificou-se que a *Bifidobacterium* Bb-12 apresentou contagem de 6.60 UFC log. g^{-1}, *Lb. plantarum* foi de 6.00 UFC log. g^{-1} e *L. acidophilus* de 6.53 UFC log. g^{-1}.

Conclusão

Os resultados mostraram ser possível o desenvolvimento de um produto cárneo funcional com aplicação de *Bifidobacterium animalis ssp. Lactis*, *Lactiplantibacillus plantarum* e *Lactobacillus acidophilus*. Os probióticos microencapsulados foram resistentes ao cozimento e a simulação da digestão gastrointestinal.

Palavras-chave: Probióticos, hambúrguer, produtos cárneos funcionais, digestão *in vitro*

GENERAL ABSTRACT

Introduction

Consumers believe that health is directly related to food, so the interest in "functional foods", which help in the prevention of diseases, is considered an opportunity for the industry to improve the quality of meat products. Currently the application of probiotics in the preparation of fermented meat products has become an alternative in the development of healthy products, since probiotics are considered live microorganisms that confer benefits to the host, when administered in adequate amounts of 10^6 CFU/g.

The benefits of probiotic strains are many, they can act beneficially to lactose intolerants, allergies, respiratory tract infection, aging, immune system modulation, among others. The species *Bifidobacterium animalis* a gram-positive, anaerobic and non-spore forming bacillus, while *Lactiplantibacillus plantarum* stands out due to its adaptability, in addition to the ability to produce several and potent bacteriocins and *Lactobacillus acidophilus* stands out for its ability to survive conditions considered adverse effects on the gastrointestinal tract.

Several studies have already carried out the incorporation of probiotic strains in fermented meat matrices, but their incorporation depends on several factors, such as the composition of the product and whether it undergoes heat treatment, which is considered a challenge since the bacteria probiotics are sensitive to heat. Thus, encapsulation can be an alternative to immobilize or trap the microorganism, protecting its cells, preventing loss of viability and enabling the application in several products.

Aims

The objective of this study was the production of burgers with the addition of the probiotics *Bifidobacterium animalis* ssp. *Lactis* Bb-12®, *Lactiplantibacillus plantarum* Lp-115® and *Lactobacillus acidophilus* LA-5® encapsulated, evaluating the physicochemical, microbiological properties, viability of probiotics in raw and cooked products and after simulation of gastrointestinal digestion, frozen at –18 ° C for 60 days.

Material and methods

This work started with the production of microcapsules, the probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* ssp. *Lactis, Lactiplantibacillus plantarum and Lactobacillus acidophilus* were used individually and added to the encapsulating solution, the microencapsulation was performed in a mini spray dryer (MSD 1.0 Labmaq, São Paulo, Brazil). For the production of burgers, 80% of beef and 20% of ground pork fat were used. The meat was added to the probiotic strains, with an initial count of 7 log $CFU.g^{-1}$, and then the burgers were molded. Five treatments were developed, the control formulation (C) without probiotics, B with *Bifidobacterium animalis* ssp. *Lactis*, P with *Lactiplantibacillus plantarum*, A with *Lactobacillus acidophilus* and BPA with the mixture of the three probiotics. Finally, the burgers were vacuum-packed and stored at freezing temperature (- 18ºC) for 60 days for further analysis. Then moisture, protein content and ash content of the treatments were analyzed according to AOAC (2005). The lipid content was determined using the methodology of Bligh and Dyer (1959). The pH was obtained with a portable digital pH meter (Hanna, HI-99163, Romania). The determination of water activity (Aw) was performed by direct reading on AquaLab 4TEV (Meter Group, USA). The previous analyzes were performed on days 0, 30, and 60 in triplicate, on raw and cooked burgers. The analyzes of substances reactive to thiobarbituric acid (TBA) were carried out according to the methodology described by Wang et. al. (2002). The texture profile analysis (TPA) was performed on the cooked burgers, according to the methodology of Bourne (1978) and the technological

parameters were obtained by weighing and measuring the raw burgers, and after cooking, cooling to room temperature was expected (25 °C) and then the products were weighed and measured again, on day 60 of storage. The color of the samples was measured using a colorimeter (Konica Minolta, CR-400, Japan), previously calibrated on a white plate. Three parameters were measured: L * (brightness), a * (red intensity) and b * (yellow intensity) in three different sample locations. Microbiological analyzes were performed on days 0, 30 and 60 of storage. The counting of coliforms at 45 ° C, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus coagulase* positive and reducing clostridia sulfites were performed according to BRASIL (2003). The viability of probiotic microorganisms present in the samples was carried out using serial decimal dilutions, followed by depth inoculations in a specific selective medium, on days 0, 15, 30 and 60. Gastrointestinal digestion in vitro was simulated according to Correa et al. (2017). The data were submitted to descriptive analysis, analysis of variance and Tukey test, at 5% significance level, where different treatments and storage periods were considered fixed effects, with the aid of software R version 1.2.5019 (R Core Team, 2016).

Results and discussion

The humidity of the raw products was not influenced by the application of probiotics, with no significant difference between the formulations ($P > 0.05$), however in the cooked products there was a reduction in humidity, and a significant difference was observed ($P < 0.01$) between the formulation BPA (58.6%), and formulations B (52.8%), P (52.6), A (53.8%). As expected, with the decrease in humidity after cooking, the values of proteins, ash and lipids increased. The protein content in the raw products varied from 19.8% to 22.2%, with no significant difference between the formulations ($P > 0.05$), as well as the ash content. There was a significant difference in the pH values ($P < 0.05$) in the raw and cooked samples, in the last there was an increase in pH on day 30 for all formulations ($P < 0.05$), followed by a drop at the end of storage ($P < 0.05$). According to some authors, this decrease in pH during the storage of meat products is attributed to the production of lactic acid by the lactic acid bacteria, however, as in this study the probiotics were encapsulated, their participation in the reactions was probably small and that is why it is possible that other lactic acid bacteria naturally present in meat may have caused this effect. In this study, Aw values ranged from 0.97 to 0.99 for raw burgers, while for cooked products these values were 0.96 to 0.99. There was a significant difference ($P < 0.05$) in the TBARS values of the burger samples compared to the control. In this sense, raw formulations A and P during storage were those that had the highest mean values, 0.18 and 0.13 mg malonaldehyde/kg, respectively, in relation to the control. After cooking, there was no significant difference ($P > 0.05$) between the probiotic treatments and the control until the 30th day of frozen storage. However, on day 60 all treatments showed an increase in TBARS values and were different from C ($P < 0.05$), although lipid oxidation is a temperature-dependent reaction, freezing is not necessarily sufficient to prevent oxidation from occurring, despite that, the values are within the acceptable value for consumption. In general, the products showed a small weight loss, showing a statistical difference ($P < 0.001$) between all treatments, ranging from 17.93 to 24.26%. There was a significant difference in the values of diameter reduction compared to the control ($P < 0.05$), with the exception of BPA. The hardness values ranged on average from 22.21 to 40.18 N, the addition of *Lb. plantarum* to the burger decreased the values of the hardness parameter (22.21 N), differing statically ($P < 0.001$) from all other formulations. It is possible that release may have occurred *Lb. plantarum* present in sample P and this produced a small amount of acids that acted in a lesser hardness. Formulation P showed

the lowest mean values of cohesiveness, elasticity and chewability, 0.30, 0.57 and 3.91, respectively. The Brightness parameter (L *) showed no significant difference (on day 30) between formulations in relation to the control (P> 0.05) and at 60 days all formulations showed a decrease in brightness compared to day 0, except for BPA, as expected, in the cooked products there was a reduction in luminosity possibly resulting from the non-enzymatic reaction during the cooking process. The a* values of the raw samples showed no difference on day 0 regardless of the probiotic used (P> 0.05). Regarding the b * values in general, the cooked samples showed higher values (~ 19.87) than the raw ones (~ 11.25). While the h * values ranged from 24.64º to 69.50º in raw and cooked formulations, respectively, the color variation being from red to reddish-orange. The result of the microbiological analyzes showed absence of *Salmonella* spp. For *Staphylococcus aureus* positive *coagulase* and reducing sulfite clostridia, counts below 2 log CFU/g were obtained, for thermotolerant coliforms at 45 ºC the counts were below 3.0 MPN/g. Regarding viability, at the beginning of storage it is possible to verify that the counts of BB-12 (raw product) varied by an average of 8.44 CFU log. g^{-1} in the BPA formulation and 10.03 CFU log. g^{-1} in formulation B, and at the end of storage both treatments showed values above 8 CFU log. g^{-1}. *Lb. plantarum* counts were higher (P <0.05) in the BPA formulation on days 0, 15 and 30, while on day 60 the P treatment showed an *Lb. plantarum* value of 9.75 CFU log. g^{-1} (P <0.05). The counting of *L. acidophilus* was possible to verify that A showed greater viability (P <0.05) at the end of the storage period (60 days). All formulations had counts above 7 CFU log. g^{-1} in the cooked product. Whereas the consumption of burger is carried out after thermal processing, the burgers in this study can be considered potentially probiotic products. After passing through the gastrointestinal tract, it was found that *Bifidobacterium* Bb-12 had a count of 6.60 CFU log. g^{-1}, *Lb. plantarum* was 6.00 CFU log. g^{-1} and *L. acidophilus* of 6.53 CFU log. g^{-1}, and the probiotic must survive the journey from mouth to colon after consumption in order to exercise its probiotic functions.

Conclusion

The results showed that it is possible to produce a functional meat product with the application of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus*. Microencapsulated probiotics were resistant to cooking and simulation of gastrointestinal digestion.

Keywords: Probiotics, burger, functional meat products, *in vitro* digestion

Aplicação de *Lactiplantibacillus plantarum* Lp-115*, Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* Bb-12 e *Lactobacillus acidophilus* La-5 em Hambúrguer

Annecler Rech de Marins[a], Talita Aparecida Ferreira de Campos[b], Andreia Farias Pereira Batista[a], Vanesa Gesser Correa[a], Rosane Marina Peralta[a], Jane Martha Graton Mikcha[a], Raquel Guttierres Gomes[b],
Andresa Carla Feihrmann[ab]

[a]Postgraduate Program in Food Science - Maringá State University - CEP: 87020-900 - Maringá - PR - Brazil.

[b]Postgraduate Program in Food Engineering - Maringá State University - CEP: 87020-900 - Maringá - PR - Brazil.

Resumo

Foram produzidas quatro formulações de hambúrguer sendo um controle (C) sem probióticos, (B) com adição de *Bifidobacterium animalis ssp. Lactis*, (P) com *Lactiplantibacillus plantarum*, (A) com *Lactobacillus acidophilus* e (BPA) com a mistura das três cepas. As amostras cozidas foram caracterizadas quanto a composição centesimal, pH, atividade de água, oxidação lipídica, cor instrumental, propriedades tecnológicas, perfil de textura, viabilidade bacteriana, características microbiológicas e resistência ao estresse intestinal durante o período de armazenamento de 60 dias a -18 °C. A adição de *Lb. plantarum* influenciou positivamente a textura e a retenção de umidade. Os teores de TBARS de todas as amostras foram baixos e a luminosidade diminuiu nos produtos cozidos como era esperado. As cepas probióticas sobreviveram ao processo de cozimento e á digestão *in vitro* dentro do limite para os produtos serem considerados probióticos favorecendo assim a produção de hambúrgueres com potencial

probiótico.

Palavras-chave: Probióticos, hambúrguer, produtos cárneos funcionais, digestão *in vitro*

Abstract

Four burgers formulations were produced, being a control (C) without probiotics, (B) with the addition of *Bifidobacterium animalis* ssp. *Lactis*, (P) with *Lactiplantibacillus plantarum*, (A) with *Lactobacillus acidophilus* and (BPA) with the mixture of the three strains. The cooked samples were characterized according to their chemical composition, pH, water activity, lipid oxidation, instrumental color, technological properties, texture profile, bacterial viability, microbiological characteristics and resistance to intestinal stress during the 60-day storage period at -18 ° C. The addition of *Lb. plantarum* positively influenced texture and moisture retention. The TBARS contents of all samples were low and the luminosity decreased in the cooked products as expected. The probiotic strains survived the cooking process and in vitro digestion within the limit for the products to be considered probiotics, thus favoring the production of burgers with probiotic potential.

Keywords: Probiotics, burger, functional meat products, *in vitro* digestion

1. Introdução

Nos dias atuais os consumidores estão mais atentos à relação alimentos e saúde, gerando uma demanda por produtos mais saudáveis (Valero-Cases, Cerdá-Bernad, Pastor, & Frutos, 2020). Os "alimentos funcionais" possuem um papel importante no bem-estar dos consumidores, além de influenciar na prevenção de doenças crônicas (Pavli et al., 2017). O interesse por alimentos funcionais é considerado uma oportunidade para a indústria melhorar a qualidade dos produtos cárneos (Pavli, Argyri, Chorianopoulos, Nychas, & Tassou, 2020).

A aplicação de probióticos na elaboração de matrizes cárneas fermentadas tem se tornado uma alternativa no desenvolvimento de produtos saudáveis e vem se consolidando (Bis-Souza, Barba, Lorenzo, Penna, & Barretto, 2019), uma vez que os probióticos são microrganismos vivos que conferem benefícios ao hospedeiro, porém precisa ser administrado em quantidades adequadas ($\geq 10^6$ UFC/g) (Shah, 2000).

Dentre os benefícios das bactérias probióticas estão a melhoria do trânsito intestinal e a exclusão competitiva de patógenos (Soni et al., 2020), além disso, elas podem atuar beneficamente aos intolerantes a lactose, alergias, infecção do trato respiratório, envelhecimento, modulação do sistema imunológico, entre outras (Casarotti et al., 2017; Goldin & Gorbach, 2008; Kaur, Kuhad, Garg, & Chopra, 2009).

As Bifidobactérias são habitantes comuns e dominantes da microbiota intestinal dos mamíferos (Duranti et al., 2018), sendo a espécie *Bifidobacterium animalis* um bacilo gram-positivo, anaeróbico e não formador de esporos. O gênero Lactobacillus é o principal e mais diversificado grupo de bactérias do ácido láctico (LAB), sendo que dentre as espécies, a *Lactiplantibacillus plantarum* se destaca devido a sua capacidade de adaptação, além da capacidade de produzir várias e potentes bacteriocinas, que são peptídeos antimicrobianos, que podem ser aplicados como conservantes de alimentos

(Seddik et al., 2017). Já a espécie *Lactobacillus acidophilus* se destaca por ser utilizada globalmente como um suplemento probiótico em alimentos funcionais, uma vez que exibe capacidade de sobreviver a condições consideradas adversas no trato gastrointestinal (baixo pH e toxicidade dos sais biliares) (Bull, Plummer, Marchesi, & Mahenthiralingam, 2013; Horackova, Vesela, Klojdova, Bercikova, & Plockova, 2020).

Vários estudos realizaram a incorporação de cepas probióticas em matrizes cárneas fermentadas (Bis-souza, Lucia, Penna, & Carla, 2020a; Bis-souza et al., 2020b; Blaiotta, Murru, Di Cerbo, Romano, & Aponte, 2018; Coelho et al., 2019; Song et al., 2018). No entanto, seu uso em produtos cárneos cozidos ainda é um desafio, pois os probióticos precisam sobreviver as altas temperaturas do processo. Poucos trabalhos são encontrados na literatura relatando a aplicação de probióticos em produtos cárneos que passaram por processos de cozimento (Jafari et al., 2017; Pérez-Chabela, Lara-Labastida, Rodriguez-Huezo, & Totosaus, 2013).

A incorporação de cepas probióticas depende de diversos fatores, pois sua funcionalidade está diretamente ligada a uma quantidade adequada de células viáveis ingeridas pelo hospedeiro, entre eles estão a composição (especiarias, sais de cura, entre outros ingredientes) e tratamento térmico dos produtos (Yadav, 2017). Assim, o encapsulamento pode ser uma proposta, pois, o microrganismo fica imobilizado ou aprisionado e, portanto as células protegidas, não perdendo a viabilidade (Cavalheiro et al., 2019; Mao, Pan, Yuan, & Gao, 2019).

Assim, objetivou-se nesse estudo a produção de hambúrgueres com adição dos probióticos *Bifidobacterium animalis* ssp. *Lactis* Bb-12®, *Lactiplantibacillus plantarum* Lp-115® e *Lactobacillus acidophilus* LA-5® encapsulados, avaliando as propriedades físico-químicas, microbiológicas, viabilidade dos probióticos nos produtos crus e cozidos e após a simulação da digestão gastrointestinal, congelados por 60 dias a –18

°C.

2. Material e métodos

2.1 Materiais probióticos

As culturas probióticas comerciais utilizadas foram a *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12® (Chr. Hansen, Honsholm, Denmark), *Lactiplantibacillus plantarum* Lp-115® (Danisco, Copenhague, Dinamarca) e o *Lactobacillus acidophilus* La-5® (Chr. Hansen, Honsholm, Dinamarca).

2.2 Produção das microcápsulas

As bactérias probióticas *Bifidobacterium animalis* ssp. *Lactis, Lactiplantibacillus plantarum* e *Lactobacillus acidophilus* foram utilizadas individualmente para a produção das microcápsulas. Para cada suspensão bacteriana a solução encapsulante foi composta por 3.2% de alginato (Sigma-Aldrich®, Brasil), 0.88% de β-ciclodextrina (Dinâmica®, Brasil) e 0.5% de goma xantana (Danisco®). Os agentes encapsulantes foram primeiramente dissolvidos em 930 mL de água peptonada, a solução foi esterilizada e posteriormente, foram adicionadas as cepas de cada probiótico. A microencapsulação dos probióticos foi realizada em mini spray dryer (MSD 1.0 Labmaq, São Paulo, Brasil), operando a uma temperatura de entrada de ar constante de 130 ± 2 °C e temperatura de saída de 94 ± 3 °C. A solução de alimentação foi mantida em temperatura ambiente (25 °C) e através de uma bomba peristáltica realizou-se a alimentação na câmara principal, a uma taxa de 0,40 L/h, taxa de ar de secagem de 30 L/min e a pressão de ar de secagem de 3 bar. As microcápsulas foram coletadas na base do ciclone, acondicionadas em frasco de vidro estéril com tampa e utilizadas no mesmo dia.

2.3 Produção dos hambúrgueres

A carne fresca bovina (umidade: 74.37%; proteína: 23.55%; e gordura: 1%) e gordura suína, ambos moídos em disco de 3 mm, foram adquiridas no comércio local da cidade de Maringá/Paraná/Brasil. Cinco tratamentos foram produzidos sendo um controle (C) sem probióticos, B com *Bifidobacterium animalis* ssp. Lactis, P com Lactiplantibacillus plantarum, A com *Lactobacillus acidophilus* e BPA com a mistura dos três probióticos. A contagem inicial adicionada de cada probiótico foi de 7 log $UFC.g^{-1}$. Não foi produzido um tratamento com probióticos livres pois em testes preliminares (dados não mostrados) as amostras apresentaram baixa viabilidade (< 3 log) durante o cozimento e, portanto, não seriam consideradas probióticas.

Os hambúrgueres foram produzidos com a mistura de 80% de carne bovina e 20% de toucinho suíno que foram moldados utilizando um moldador manual com 8 cm de diâmetro e 1,5 cm de espessura. Após, foram embalados a vácuo em embalagens de polietileno e submetidos ao congelamento a -18 °C até a realização das análises. Todos os tratamentos foram preparados em triplicata sendo que para cada tratamento foram produzidos 10 hambúrgueres (~ 80g) totalizando 30 hambúrgueres por tratamento. Para a realização das análises os hambúrgueres foram descongelados a 8 °C por 12 horas, e posteriormente assados em grelha elétrica (Grill Perfect Taste, Cadence, Balneário Piçarras, Brasil), por aproximadamente 6 minutos de cada lado, até a temperatura central atingir 72 °C, controlada através do uso de um termômetro tipo espeto (Incoterm, Porto Alegre, Brasil) e resfriados até 25 °C para a realização das análises. O sal foi adicionado na parte externa do produto antes do cozimento de forma a simular a preparação para o consumidor. Três amostras por lote por tratamento foram usadas para a realização das análises. As análises foram realizadas nas amostras cruas e cozidas, com exceção de textura e da digestão gastrointestinal in vitro, que foram realizadas somente nos produtos cozidos.

2.4. Composição centesimal, pH e atividade de água (Aw)

A determinação de umidade, cinzas e proteína foi realizada de acordo com a metodologia da AOAC (2005). O teor de lipídios foi determinado pela metodologia de Bligh e Dyer (1959). O pH foi obtido com phmetro digital portátil (Hanna, HI-99163, Romania) calibrado antes e após cada medição usando padrões de pH 4.0, 7.0 e 10.0. A Aw foi determinada em temperatura ambiente (25 °C), utilizando medidor de atividade de água Aqualab 4TE (Meter Group, USA). A composição centesimal foi avaliada no final do armazenamento (dia 60), o pH e a Aw foram avaliados nos dias 0, 30 e 60, e todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.5 Oxidação lipídica (TBARS)

A análise de oxidação lipídica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Raharjo et al. (1992), modificado por Wang et. al. (2002). Foram adicionados 0,5 mL de BHT (di-terc-butil metil fenol) 0.5% em um tubo contendo 5 g de amostra. Posteriormente, foram adicionados 18 mL de TCA (ácido tricloroacético) 5% e realizada a filtração. Em uma alíquota de 2 mL do filtrado foram adicionados 2 mL de TBA (ácido 2-tiobarbitúrico) 0,08 M e a reação foi conduzida em banho-maria a 80 ºC por 40 min. Após a finalização da reação foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Agilent UV-8553) a 531 nm. A quantificação foi realizada frente a uma curva padrão (1. 10-8 a 10.10-8 mol/mL) de solução de tetraetoxypropane (TEP). Os resultados foram expressos em miligramas de malonaldeído por quilograma de amostra. As análises foram realizadas nos dias 0, 30 e 60, em triplicata.

2.6 Propriedades tecnológicas e perfil textura

As propriedades tecnológicas foram realizadas em triplicata, no dia 60. Os hambúrgueres crus foram pesados e medidos, posteriormente foi realizado o cozimento, aguardado o resfriamento até temperatura ambiente (25 °C) e então os produtos foram

pesados e medidos novamente. A perda pelo cozimento e a redução de diâmetro foram calculadas através das equações 1 e 2:

$$\%\ perda\ por\ cozimento = \frac{Peso_{cru} - Peso_{cozido}}{Peso_{cru}} \quad (1)$$

$$\%\ redução\ diâmetro = \frac{Diâmetro_{cru} - Diâmetro_{cozido}}{Diâmetro_{cru}} \quad (2)$$

A análise de textura foi realizada de acordo com Bourne (1978). Os hambúrgueres cozidos foram cortados em cilindros de 2 cm de diâmetro e submetidos ao texturômetro (modelo TAXT2, Stable Micro System), sendo comprimidos duas vezes até 50% do seu tamanho. A probe utilizada foi a Probe P/36R (cilindro de 36 mm de diâmetro), na velocidade de pré-teste de 1 mm/s e velocidade durante o teste de 5 mm/s. Foram avaliados os parâmetros dureza (N), coesividade, elasticidade (mm) e mastigabilidade (N). Os tratamentos foram avaliados no dia 60, e todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.7 Cor instrumental

A determinação de cor instrumental foi realizada utilizando colorímetro (Konica Minolta, CR-400, Japan). O equipamento foi calibrado utilizando o branco (L*= 85,79, a*= -0,45 e b*= 3,98), com iluminante D65, 10º observador padrão, tamanho de abertura de 8 mm de diâmetro. O produto foi avaliado através de medições em 3 pontos em cada lado do produto, e os resultados foram expressos pelo sistema CIE L* (luminosidade) a* (variação de vermelho a verde) e b* (variação de amarelo a azul). O croma (C*) e o ângulo de matiz (h°) das amostras foram calculados através das equações 3 e 4:

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (3)$$

$$h^\circ = tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (4)$$

As análises foram realizadas nos dias 0, 30 e 60, em triplicata.

2.8 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas para coliformes a 45 °C, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus coagulase* positiva e Clostrídios sulfito redutores foram realizadas de acordo com BRASIL (2003). As análises foram realizadas nos dias 0, 30 e 60, em triplicata. Os resultados foram expressos em número mais provável (NMP) para coliformes a 45 °C e em unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) para os demais microrganismos.

2.9 Viabilidade dos microrganismos probióticos

A viabilidade dos microrganismos probióticos presentes nas amostras foi realizada a partir de diluições decimais seriadas. Foram pesadas 10 g da amostra e transferidas para um frasco de Erlenmeyer estéril contendo 90 mL de água peptonada 0.1%. A mistura foi homogeneizada, e em seguida foram realizadas diluições subsequentes utilizando o mesmo diluente e as inoculações foram feitas por profundidade em meio seletivo específico. Para contagem de *Bifidobacterium* Bb-12 foi utilizado o meio BSM (Bifidus Selective Medium), para contagem de *Lb. plantarum* o meio MRS (Man, Rogosa e Sharpe) e para *L. acidophilus* o meio MRS modificado. A incubação foi realizada sob condições anaeróbicas (Anaerobac) a 37º C por 48 horas. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g). As análises foram realizadas nos dias 0, 15, 30 e 60, em duplicata.

2.10 Digestão gastrointestinal in vitro

A digestão gastrointestinal in vitro foi simulada de acordo com Correa et al. (2017). O produto cozido foi resfriado até atingir 60 °C (item 2.3), uma alíquota de 10 g foi pesada e macerada, para simulação da mastigação e então adicionada em 30 mL de solução de saliva artificial (2,38 g Na2HPO4, 0,19 g KH2PO4, 8 g NaCl em 1 L de água destilada). O pH foi ajustado para 6,75 a 37 °C e a enzima α-amilase foi adicionada para obter 200 U de atividade enzimática, com agitação de 150 rpm durante 10 min. Antes da adição da solução gástrica, o pH foi ajustado para 1,2, e então, 30 mL de fluido gástrico artificial (0,32 g de pepsina em 100 mL de NaCl (0,03 M)), pH 1,2, foram adicionados. A solução foi incubada a 37 °C durante 120 min, com agitação a 150 rpm. Por fim, o pH foi ajustado para 6,0 após adição de 5 mL de NaCl (120 mM), 5 mL de KCl (5 mM) e 30 mL de fluido intestinal artificial (0,15 g de pancreatina e 0,9 g de extrato biliar em 100 mL de NaHCO3 (0,1 M)). A mistura foi então incubada a 37 °C durante 60 min sob agitação a 150 rpm. A suspensão final obtida da fase intestinal foi submetida à avaliação da viabilidade, conforme o item 2.9. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g). Essa análise foi realizada utilizando a formulação BPA no final do armazenamento (dia 60) em triplicata.

2.11 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise descritiva, análise de variância e teste Tukey, a 5% de significância, onde os diferentes tratamentos e os períodos de armazenamento foram considerados efeitos fixos, com auxílio do software R versão 1.2.5019 (R Core Team, 2016).

3. Resultados e discussão

3.1. Composição centesimal, pH e Aw

A composição centesimal dos hambúrgueres é apresentada na Tabela 1. É possível verificar que a umidade dos produtos crus não foi influenciada pela aplicação dos probióticos, não havendo diferença significativa entre as formulações (P > 0.05). Outros estudos também verificaram que a adição de probióticos não mostrou influência no teor de umidade em produtos cárneos. (Ben Slima et al., 2017; Trabelsi et al., 2019). Por outro lado, nos produtos cozidos houve redução de umidade, sendo que foi observada diferença significativa (P < 0.01) entre a formulação BPA (58.6%), indicando um maior rendimento, e as formulações B (52.8%), P (52.6%), A (53.8%), enquanto o controle (56.4%) não diferiu de nenhuma formulação (P > 0.05). Pérez-Chabela, Lara-Labastida, Rodriguez-Huezo, & Totosaus (2013) encontraram uma relação positiva entre a inoculação de *Lb. plantarum*, em carne cozida e a retenção de umidade, mas nesse caso os probióticos não estavam encapsulados, diferentemente de nosso estudo.

Tabela 1
Efeito da aplicação de bactérias probióticas na composição centesimal dos hambúrgueres

	Cru					EPM	Sig.	Cozido					EPM	Sig.
	C	**B**	**P**	**A**	**BPA**			**C**	**B**	**P**	**A**	**BPA**		
Umidade (%)	66.3^{a}	66.4^{a}	68.0^{a}	67.1^{a}	67.0^{a}	1.1	n.s	56.4^{ab}	52.8^{b}	52.6^{b}	53.8^{b}	58.6^{a}	0.9	**
Cinzas (%)	1.05^{a}	1.02^{a}	1.15^{a}	1.18^{a}	1.03^{a}	0.04	n.s.	1.6^{b}	1.6^{b}	2.0^{a}	1.9^{a}	2.0^{a}	0.05	***
Proteína (%)	22.07^{a}	21.07^{a}	22.22^{a}	19.83^{a}	21.28^{a}	0.6	n.s.	30.43^{a}	24.84^{b}	27.48^{ab}	23.42^{b}	27.04^{ab}	0.8	**
Lipídios (%)	8.56^{b}	8.23^{bc}	8.74^{b}	12.14^{a}	6.57^{c}	0.3	***	8.64^{cd}	8.89^{c}	12.67^{b}	14.35^{a}	7.55^{d}	2.74	***

$^{a-d}$ Valores médios na mesma linha seguidas de diferentes letras indicam diferença significativa ($P < 0.05$). C: sem adição de probióticos; B: Bb-12; P: *Lb. plantarum*; A: *L. acidophilus*; BPA: Bb-12 + *Lb. Plantarum* + *L. acidophilus*.
EPM: erro padrão da média.
Sig.: significância; n.s. (não significante).
*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

Como esperado, com a diminuição da umidade após o cozimento, os valores de proteínas, cinzas e lipídios apresentaram um aumento, que pode ser devido à relação

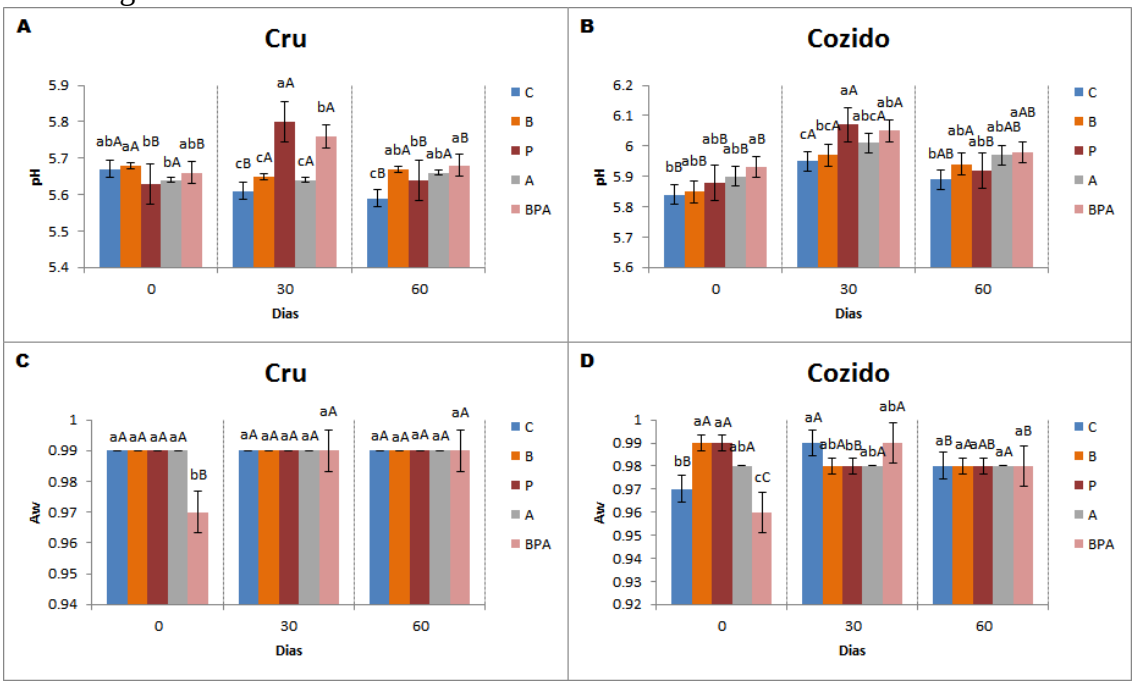
inversa da quantidade de umidade e gordura nos alimentos (Araújo et al., 2020). O conteúdo de proteína nos produtos crus variou de 19.8% a 22.2%, não apresentando diferença significativa entre as formulações ($P > 0.05$), assim como o teor de cinzas. Valores similares foram reportados por Trabelsi et al. (2019) ao aplicar *Lactobacillus plantarum* TN8 em carne moída.

A formulação A (crua) apresentou o maior teor de lipídios (12.14%), diferindo das demais formulações ($P < 0.001$). Esse fato pode ter ocorrido devido às variações na composição da matéria-prima. Por outro lado, para os produtos cozidos houve um aumento nos teores de lipídios em todas as formulações, provavelmente pela diminuição da umidade, assim como observado por do Prado et al. (2019).

Na Figura 1 são apresentados os valores de pH e Aw dos hambúrgueres crus e cozidos com adição de probióticos durante o congelamento por 60 dias. Verifica-se que a adição dos probióticos encapsulados e o tempo de armazenamento influenciaram significativamente nos valores de pH ($P < 0.05$) nas amostras cruas (Figura 1A) e cozidas (Figura 1B), sendo que os valores médios variaram entre 5,59 a 5,80 nas amostras cruas e 5,84 a 6,08 nas cozidas. No final do período de armazenamento as amostras cruas com probióticos foram diferentes do controle ($P < 0.05$) e no caso das amostras cozidas foi verificado um aumento do pH no dia 30 para todas as formulações ($P < 0.05$), seguido de uma queda no final do armazenamento ($P < 0.05$). Segundo alguns autores, essa diminuição do pH durante o armazenamento dos produtos cárneos é atribuída a produção de ácido láctico pelas bactérias lácticas (Sharma et al., 2017), como nesse estudo os probióticos estavam encapsulados, a participação desses microrganismos nas reações provavelmente tenha sido pequena (Ningtyas, Bhandari, Bansal, & Prakash, 2019), por isso é possível que outras bactérias lácticas presentes naturalmente na carne podem ter provocado esse efeito. Comportamento semelhante foi

relatado por Lopes et al., (2021), que ao adicionar probióticos encapsulados em queijo concluíram que as cápsulas podem ter evitado a interação entre a matriz alimentar e a cepa probiótica evitando alterações na composição.

Fig. 1 Resultado da aplicação de bactérias probióticas nos valores de pH e Aw dos hambúrgueres crus e cozidos



[a-c] Os valores médios com letras diferentes apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0.05$).
[A-C] Os valores médios com letras diferentes apresentaram diferenças significativas entre os dias ($P < 0.05$).
C: sem adição de probióticos; B: Bb-12; P: *Lb. plantarum*; A: *L. acidophilus*; BPA: Bb-12 + *Lb. Plantarum* + *L. acidophilus*.

Ben Slima et al. (2018) ao aplicar *Lactiplantibacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici* em salsichas frescas relataram diminuição do pH. De acordo com Prado et al. (2019), o pH é um indicador da qualidade da carne e deve estar entre 5,8 e 6,2, sendo assim, os hambúrgueres do estudo são considerados aptos para consumo.

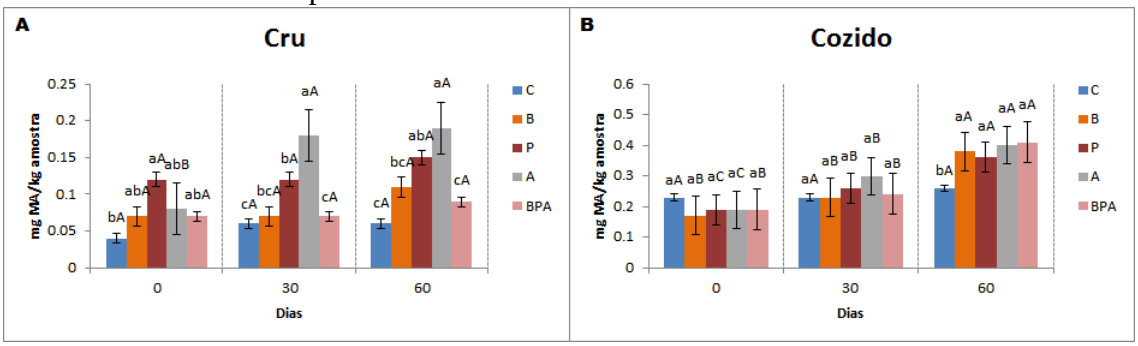
A atividade de água influencia grandemente na estabilidade da vida de prateleira dos produtos alimentícios (Song et al., 2018). Nesse estudo, os valores variaram de 0,97 a 0,99 para os hambúrgueres crus (Figura 1C), enquanto para os produtos cozidos esses valores foram de 0,96 até 0,99 (Figura 1D). O tratamento BPA foi diferente do controle

(P < 0.05) no dia zero (cru), porém nos dias 30 e 60 as amostras com probióticos não apresentaram diferença em relação ao controle (P > 0.05). Nos produtos cozidos houve diferença até o dia 30, mas no final do armazenamento de 60 dias todas as amostras foram iguais. As formulações (cruas e cozidas) apresentaram valores de Aw semelhantes ao encontrado por outros estudos para esse tipo de produto (Alves et al., 2020; Heck et al., 2017).

3.2. Oxidação lipídica- TBARS

Houve diferença significativa (P < 0.05) nos valores de TBARS (Figura 2) das amostras de hamburgueres em relação ao controle. Nesse sentido, as formulações cruas A e P durante o armazenamento foram as que apresentaram os maiores valores médios, 0,18 e 0,13 mg malonaldeído/kg, respectivamente, em relação ao controle. Yadav (2017) relatou propriedades antioxidantes do *Lb. plantarum* em salsichas de frango com carne fermentada, o que não foi observado nesse estudo, provavelmente como já foi citado, os probióticos foram encapsulados e não estavam totalmente disponíveis para agir como antioxidante.

Fig. 2 Valores de TBARS (mg de malonaldeído / kg de produto) dos hambúrgueres crus e cozidos com bactérias probióticas.



a-c Os valores médios com letras diferentes apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (*P* < 0.05).
A-B Os valores médios com letras diferentes apresentaram diferenças significativas entre os dias (*P* < 0.05).
C: sem adição de probióticos; B: Bb-12; P: *Lb. plantarum*; A: *L. acidophilus*; BPA: Bb-12 + *Lb. Plantarum* + *L. acidophilus*.

Após o cozimento, não houve diferença significativa (P > 0.05) entre os

tratamentos com probióticos e o controle até o dia 30 de armazenamento congelado. Entretanto, no dia 60 todos os tratamentos apresentaram aumento nos valores de TBARS e foram diferentes de C ($P < 0.05$). O malonaldeído (MDA) é o principal produto secundário da oxidação lipídica e é amplamente avaliado pelo ensaio de TBARS, em geral a oxidação lipídica é uma reação dependente das temperaturas e quanto mais baixas as temperaturas, mais lenta é a taxa de oxidação, porém o armazenamento congelado não é necessariamente suficiente para evitar a ocorrência de oxidação (Leygonie, Britz, & Hoffman, 2012; Wang, He, Gan, & Li, 2018).

Apesar disso, os valores de TBARS tanto para os produtos crus quanto para os cozidos, foram mais baixos que os encontrados para esse mesmo tipo de produto (Patinho et al., 2021; Subtil et al., 2019) e estão dentro do valor aceitável para o consumo que segundo Zhang et al. (2019) a carne bovina é considerada aceitável até valores abaixo de 2,5 mg de malonaldeído/ kg.

3.3. Propriedades tecnológicas e perfil textura

Na Tabela 2 são apresentados os resultados das propriedades tecnológicas e dos parâmetros de textura dos hambúrgueres. A perda pelo cozimento apresentou diferença estatística ($P < 0.001$) entre todos os tratamentos, variando de 17.93 a 24.26%. É possível verificar que o tratamento P cru apresentou o menor valor, e esse resultado pode ser considerado positivo uma vez que a perda pelo cozimento não é interessante para o produto. Em geral, os produtos apresentaram uma perda de peso pequena e esse comportamento pode estar correlacionado com o pH, já que de acordo com Ribeiro et al. (2021) valores mais altos de pH que estão longe do ponto isoelétrico das proteínas, provocam um aumento da capacidade de retenção de água e explicam a menor perda por cocção dos produtos. Resultados semelhantes foram apresentados por do Prado et al. (2019) e Polizer-Rocha et al. (2020). Houve diferença significativa nos valores de

redução de diâmetro em relação ao controle (P < 0.05), com exceção de BPA. A redução de diâmetro está intimamente relacionada com a perda de peso, sendo que quanto menor a perda de peso menor será a redução do diâmetro.

Tabela 2
Propriedades tecnológicas e parâmetros de textura dos hambúrgueres adicionados de probióticos

	Formulações					EPM	Sig.
	C	**B**	**P**	**A**	**BPA**		
Propriedades tecnológicas (%)							
Perda cozimento	22.23^{c}	24.26^{a}	17.93^{e}	23.23^{b}	20.38^{d}	2.32	***
Redução diâmetro	22.36^{c}	25.10^{a}	22.63^{d}	24.04^{b}	23.11^{c}	1.07	***
Parâmetros textura							
Dureza (N)	39.61^{b}	37.96^{c}	22.21^{d}	39.62^{abc}	40.18^{a}	7.78	***
Coesividade	0.51^{a}	0.53^{a}	0.30^{c}	0.53^{a}	0.32^{b}	0.11	***
Elasticidade (mm)	0.86^{b}	0.87^{a}	0.57^{d}	0.83^{c}	0.86^{abc}	0.13	**
Mastigabilidade (N)	17.61^{ab}	17.75^{a}	3.91^{d}	17.50^{b}	11.14^{c}	5.92	***

$^{a\text{-}e}$ Valores médios na mesma linha seguidas de diferentes letras indicam diferença significativa ($P < 0.05$). C: sem adição de probióticos; B: Bb-12; P: *Lb. plantarum*; A: *L. acidophilus*; BPA: Bb-12 + *Lb. Plantarum* + *L. acidophilus*.
EPM: erro padrão da média.
Sig.: significância; n.s. (não significante).
*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

Os parâmetros de textura avaliados podem ser observados na Tabela 2. Os valores de dureza variaram em média de 22.21 a 40.18 N. A adição de *Lb. plantarum* ao hambúrguer diminuiu os valores do parâmetro dureza (22.21 N) diferindo estaticamente (P < 0.001) de todas as outras formulações. Pérez-Chabela et al. (2013) em um estudo

com linguiças obtiveram uma textura significativamente (P <0,05) menos dura e elástica ao adicionar *Lb. plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*, como observado nesse trabalho na amostra P. Segundo Arief, Afiyah, Wulandari, & Budiman (2016), a textura mais macia de amostras contendo *Lb. plantarum* pode ser devido à maior quantidade de ácidos orgânicos produzidos pelos mesmos, uma vez que os ácidos orgânicos são conhecidos por afetar proporcionalmente a maciez do produto. É possível que possa ter ocorrido liberação do *Lb. plantarum* presente na amostra P e este produzido uma pequena quantidade de ácidos que agiram numa menor dureza. Todas as formulações foram diferentes do controle (P < 0.001) com exceção de A em relação ao parâmetro dureza. A formulação P apresentou os menores valores médios de coesividade, elasticidade e mastigabilidade, 0,30, 0,57 e 3,91, respectivamente. Esses valores são coerentes já que essa formulação foi a que apresentou menor dureza e perda por cozimento.

3.4. Cor instrumental

Na Tabela 3 são apresentados os parâmetros de cor dos hambúrgueres com adição de probióticos. É possível observar que o tratamento A cru apresentou no início do armazenamento (dia 0) maior valor de L* (48.46) enquanto BPA se apresentou estatisticamente menor (P < 0.01) que as outras formulações. No entanto, no dia 30 não houve diferença significativa entre as formulações em relação ao controle (P > 0.05) e aos 60 dias todas as formulações apresentaram uma diminuição na luminosidade em relação ao dia 0, com exceção de BPA. Trabelsi et al. (2019) também observaram esse comportamento na formulação de carne bovina moída inoculada com *Lb. plantarum*. Como esperado, nos produtos cozidos houve uma redução da luminosidade possivelmente resultante da reação não enzimática durante o processo de cozimento, sendo que no dia 60 a formulação controle apresentou um valor significativamente maior (P < 0.05) que P, A e BPA.

Tabela 3
Efeito da aplicação de bactérias probióticas nos parâmetros de cor dos hambúrgueres crus e cozidos

		Cru					EPM	Sig.	Cozido					EPM	Sig.
		C	B	P	A	BPA			C	B	P	A	BPA		
Parâmetros de cor															
L*	**Dia 0**	44.16^{cAB}	46.60^{abcA}	46.40^{bA}	48.46^{aA}	41.22^{dB}	2.74	**	32.51^{aB}	35.35^{aA}	34.04^{aA}	36.28^{aA}	33.69^{aA}	2.36	n.s.
	Dia 30	47.58^{aA}	45.94^{aA}	44.22^{aA}	46.39^{aAB}	45.85^{aA}	1.95	n.s.	33.82^{aB}	36.61^{aA}	33.91^{aA}	34.96^{aA}	34.08^{aA}	1.45	n.s.
	Dia 60	42.36^{dB}	45.07^{abcA}	46.08^{aA}	43.86^{cB}	44.49^{bAB}	1.71	*	39.05^{aA}	37.95^{abA}	33.34^{cA}	34.84^{bA}	33.98^{cA}	3.03	*
	EPM	2.60	2.22	1.49	2.42	2.49			3.25	2.37	2.17	2.01	0.76		
	Sig.	*	n.s.	n.s.	*	*			**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
a*	**Dia 0**	19.62^{aA}	22.77^{aA}	19.52^{aA}	22.80^{aA}	19.57^{aA}	3.31	n.s.	7.56^{cB}	11.13^{abA}	11.36^{aA}	11.05^{bA}	8.53^{dB}	1.70	***
	Dia 30	14.89^{dA}	15.59^{bB}	15.19^{cA}	19.02^{abcB}	20.55^{aA}	2.94	*	9.74^{bA}	9.47^{cB}	9.90^{bcA}	9.45^{dB}	11.94^{aA}	1.15	*
	Dia 60	16.55^{dA}	25.33^{aA}	19.51^{cA}	22.57^{abcA}	20.41^{bA}	3.53	**	8.19^{dB}	8.94^{cB}	9.82^{bA}	10.07^{abcAB}	10.84^{aB}	1.12	**
	EPM	4.23	4.70	2.81	2.10	2.15			1.10	1.06	0.95	0.88	1.73		
	Sig.	n.s.	**	n.s.	*	n.s.			*	**	n.s.	*	*		
b*	**Dia 0**	11.53^{cA}	13.67^{abcA}	11.91^{bA}	14.78^{aA}	10.30^{dA}	2.15	*	16.00^{dB}	20.91^{aA}	20.21^{cA}	20.45^{abcA}	20.45^{bA}	2.24	*
	Dia 30	9.20^{aA}	8.75^{aB}	9.42^{aA}	11.38^{aAB}	12.05^{aA}	2.26	n.s.	19.92^{abcAB}	19.32^{bA}	18.44^{cA}	17.46^{dB}	23.34^{aA}	2.57	*
	Dia 60	8.45^{dA}	15.09^{aA}	11.58^{abcA}	10.37^{bB}	10.30^{cA}	2.66	**	21.89^{abcA}	18.32^{dA}	18.74^{cA}	19.98^{bAB}	22.63^{aA}	2.16	*
	EPM	1.86	3.26	1.81	2.42	2.41			3.02	2.11	1.60	1.69	1.65		
	Sig.	***	**	n.s.	*	n.s.			*	n.s.	n.s.	*	***		
C*	**Dia 0**	22.83^{bA}	26.56^{aA}	22.86^{bA}	27.20^{aA}	22.17^{bA}	3.65	*	17.71^{dB}	23.86^{aA}	23.18^{bA}	23.25^{abcA}	22.17^{cB}	2.57	**
	Dia 30	17.51^{bA}	18.02^{bB}	17.90^{bA}	22.16^{aB}	23.86^{aA}	3.42	*	22.18^{abcAB}	21.70^{bdA}	20.93^{cA}	19.83^{dB}	26.21^{aA}	2.70	*
	Dia 60	18.62^{dA}	29.48^{aA}	22.73^{cA}	24.87^{abAB}	23.54^{bcA}	4.04	**	23.36^{abA}	20.38^{dA}	21.16^{cA}	22.38^{bcAB}	25.09^{aAB}	2.17	*
	EPM	4.37	5.43	3.18	2.56	2.65			3.03	2.19	1.78	1.80	2.15		

	Sig.	n.s.	***	n.s.	*	n.s.			*	n.s.	n.s.	*	*		
h*	**Dia 0**	31.51^{aA}	30.97^{aA}	31.37^{aA}	32.85^{aA}	27.86^{aA}	3.65	n.s.	64.57^{abB}	61.09^{cA}	60.63^{dA}	61.61^{bcA}	67.41^{aA}	3.27	*
	Dia 30	31.55^{aA}	29.50^{aA}	31.82^{aA}	30.88^{aAB}	29.93^{aA}	4.30	n.s.	63.90^{abcB}	64.05^{aA}	61.76^{cA}	61.60^{dA}	62.91^{bcB}	1.83	***
	Dia 60	27.43^{aA}	30.74^{aA}	30.71^{aA}	24.64^{aB}	28.78^{aA}	5.12	n.s.	69.50^{aA}	63.96^{bA}	62.26^{dA}	63.28^{cA}	64.41^{bAB}	2.78	***
	EPM	4.43	4.81	2.87	4.39	5.87			2.99	2.37	1.45	1.79	2.50		
	Sig.	**	n.s.	n.s.	*	n.s.			*	n.s.	n.s.	n.s.	*		

$^{a-d}$ Valores médios na mesma linha seguidas de diferentes letras indicam diferença significativa ($P < 0.05$).
$^{A-B}$ Valores médios na mesma coluna seguidas de diferentes letras indicam diferença significativa ($P < 0.05$).
C: sem adição de probióticos; B: Bb-12; P: *Lb. plantarum*; A: *L. acidophilus*; BPA: Bb-12 + *Lb. Plantarum* + *L. acidophilus*.
EPM: erro padrão da média.
Sig.: significância; n.s. (não significante).
*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

Os valores de a* das amostras cruas não apresentaram diferença no dia 0 independente do probiótico utilizado ($P > 0.05$). No entanto, nos dias 30 e 60 as formulações BPA e A apresentaram as maiores médias ($P < 0.05$) (20.55 e 25.33), respectivamente, diferindo do controle.

A respeito dos valores de b* no geral as amostras cozidas mostraram valores maiores (~19,87) do que os crus (~11,25). Os tratamentos P e B crus foram significativamente maiores ($P < 0.05$) que C no dia 60, o que pode ser considerado vantajoso, uma vez que a diminuição dos valores b* está relacionada à oxidação da metamioglobina (Salueña, Gamasa, Manuel, & Rubial, 2019).

Ao final do armazenamento (dia 60), as formulações B, P e A cruas apresentaram valores maiores ($P < 0.01$) de C* em comparação ao controle, o que é interessante uma vez que um valor mais alto de C* significa maior vivacidade de cor (Salueña, Gamasa, Manuel, & Rubial, 2019), o que pode influenciar na compra do produto. Os valores de h* variaram de 24.64º a 69.50º nas formulações cruas e cozidas, respectivamente, sendo a variação de cor do vermelho ao laranja-avermelhado. O ângulo de matiz (h*) determina a saturação da cor e é expresso em graus sendo 0° para vermelho (+a), 90° para amarelo (+b), 180° para verde (-a) e 270° para azul (-b) (AMSA, 2012).

3.5. Análises microbiológicas

Os resultados das análises microbiológicas, indicadoras da qualidade do produto, mostraram ausência de salmonella spp. Para Staphylococcus aureus coagulase positiva e clostrídios sulfito redutores foram obtidas contagens abaixo de 2 log UFC. g^{-1}, para coliformes termotolerantes a 45 ºC as contagens foram abaixo de 3.0 NMP. g^{-1}. Esses resultados estão de acordo com a Legislação Brasileira (BRASIL, 2000), e as Boas Práticas de Fabricação (BPF), a boa qualidade da matéria-prima além dos hambúrgueres terem sido embalados a vácuo e armazenados sobre congelamento podem ter

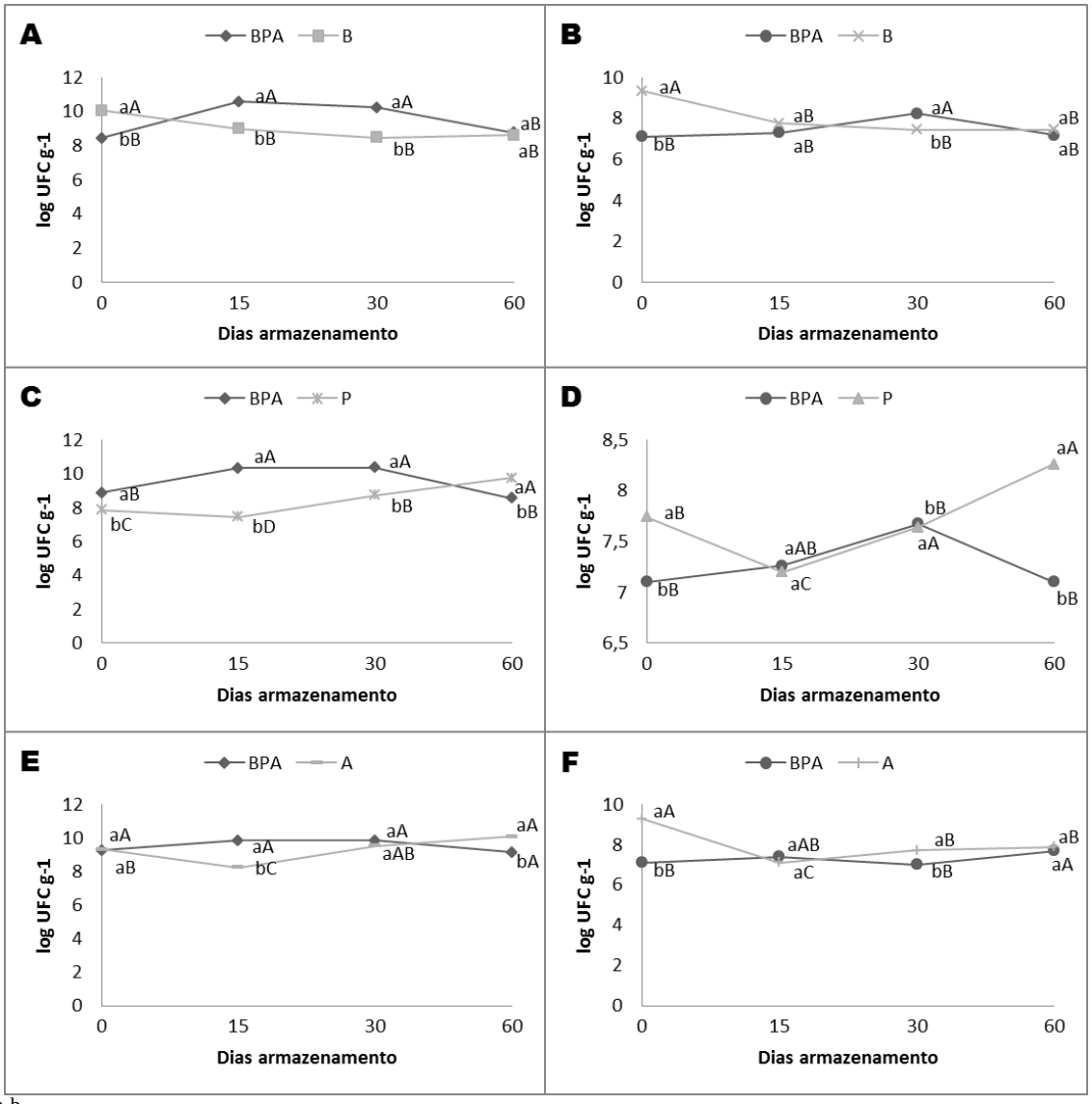
contribuído para esses resultados. A contaminação por microrganismos na indústria da carne causa sérios problemas de segurança e qualidade (Khalili & Javad, 2019) por isso é importante assegurar a qualidade microbiológica dos produtos cárneos.

3.6. Viabilidade dos microrganismos probióticos

A contagem dos microrganismos probióticos foi realizada comparando a formulação BPA contendo a mistura dos três probióticos, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* Bb-12 e *Lb. Plantarum*, com as outras formulações contendo os probióticos individualmente, B contendo *Bifidobacterium* Bb-12, P com adição de *Lb. Plantarum* e A com adição de *L. acidophilus*.

A Figura 3 apresenta a contagem do probiótico *Bifidobacterium* Bb-12 nas formulações BPA (3A) e B (3B) durante o período de armazenamento dos produtos crus e cozidos, respectivamente. No início, é possível verificar que as contagens de BB-12 variaram em média de 8.44 UFC log. g^{-1} na formulação BPA e 10.03 UFC log. g^{-1} na formulação B, sendo que no final do armazenamento ambos os tratamentos apresentaram valores acima de 8 UFC log. g^{-1} (Figura 3A). Song et al. (2018) ao utilizarem *Bifidobacterium longum* KACC 91563 encapsulado em salsichas fermentadas obtiveram valores mais baixos comparados a esse estudo. Após o cozimento, a BB-12 (Figura 3B) apresentou uma diminuição em todos os dias de armazenamento sendo que, no dia 60 foi de ~1,58 UFC log. g^{-1} para o tratamento BPA e ~1,18 UFC log. g^{-1} para o tratamento B, porém permaneceu viável acima de 7 UFC log. g^{-1}.

Fig. 3 Viabilidade das bactérias probióticas nos hambúrgueres crus e cozidos, contagem de Bb-12 (A e B); *Lb. plantarum* (C e D); *L. acidophilus* (E e F).



[a-b] Os valores médios com letras diferentes apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0.05$).
[A-B] Os valores médios com letras diferentes apresentaram diferenças significativas entre os dias ($P < 0.05$).
C: sem adição de probióticos; B: Bb-12; P: *Lb. plantarum*; A: *L. acidophilus*; BPA: Bb-12 + *Lb. Plantarum* + *L. acidophilus*.

Nas Figuras 3C e 3B verificam-se os valores obtidos na contagem de *Lb. plantarum* das formulações BPA e P. As contagens de *Lb. plantarum* foram maiores (P <0.05) na formulação BPA (Figura 3C) nos dias 0, 15 e 30, enquanto no dia 60 o tratamento P apresentou valor de *Lb. plantarum* de 9.75 UFC log. g^{-1} ($P < 0.05$). No produto cozido (Figura 3D) P demonstrou maior viabilidade ao final do armazenamento

com os valores finais de 8.26 UFC log. g^{-1}, valores estes, próximos aos encontrados em outros estudos (Blaiotta et al., 2018; Cavalheiro et al., 2019; Pavli, Argyri, Chorianopoulos, Nychas, & Tassou, 2020; Rubio et al., 2013).

Pérez-Chabela, Lara-Labastida, Rodriguez-Huezo, & Totosaus (2013) ao aplicar bactérias ácido láticas encapsuladas em emulsões cárneas, encontraram valores de viabilidade acima de 6 UFC log. g^{-1}, sendo assim considerado um produto cárneo probiótico.

A contagem de *L. acidophilus* nas formulações BPA e A são apresentadas nas Figuras 3E e 3F. Nas amostras cruas (Figura 3E), é possível verificar que A apresentou maior viabilidade ($P < 0.05$) no final do período de armazenamento (60 dias). Arief, Afiyah, Wulandari, & Budiman (2016) encontraram valores de LAB de 9.45 UFC log. g^{-1} em salsicha fermentada com adição de *L. acidophilus*, valores semelhantes ao nosso estudo que mostrou média de 9.6 UFC log. g^{-1}.

Nos produtos cozidos (Figura 3F) as contagens foram superiores a 7 UFC log. g^{-1} nos dois tratamentos, sendo que no dia 60 de armazenamento BPA apresentou média de 7.69 e A obteve média de 7.88 UFC log. g^{-1}.

O calor é considerado um desafio para a sobrevivência dos probióticos, porém bactérias secas por pulverização geralmente exibem maior resistência ao calor quando comparadas às bactérias livres e é considerada uma regra geral que o número de bactérias probióticas no consumo de alimentos deve ser de pelo menos 10^6 UFC. g^{-1} (Shah, 2000).

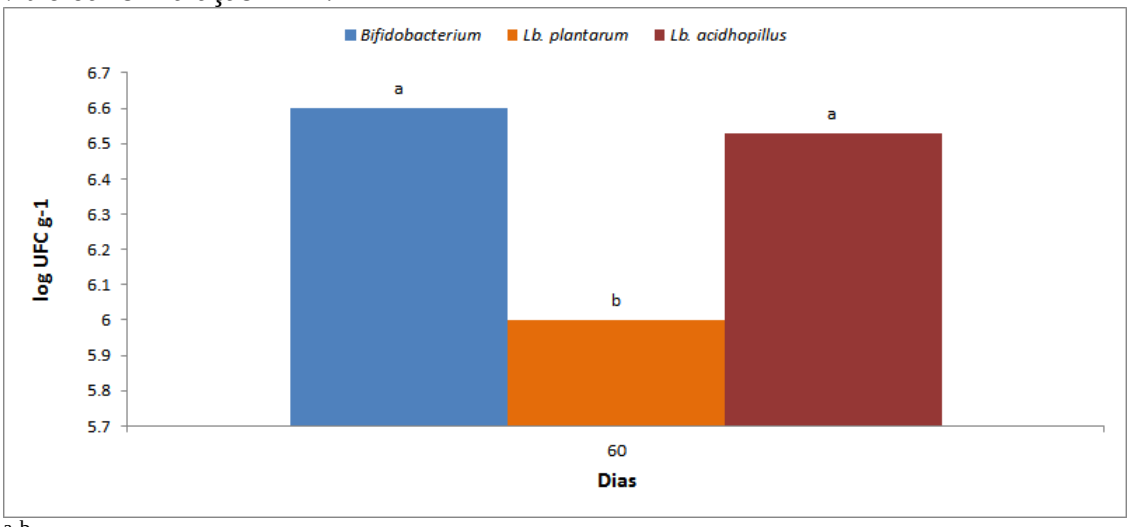
Os resultados da viabilidade demonstraram a eficácia e potencialidade da microencapsulação das bactérias probióticas utilizadas na aplicação de produtos cozidos, pois todas as formulações apresentaram contagens acima de 7 UFC log. g^{-1} após o cozimento. Considerando que o consumo de hambúrguer é realizado após o

processamento térmico, os hambúrgueres do presente estudo podem ser considerados produtos probióticos (Castro, Tornadijo, Fresno, & Sandoval, 2015; Nualkaekul, Lenton, Cook, Khutoryanskiy, & Charalampopoulos, 2012).

3.7. Digestão gastrointestinal in vitro

Os valores da viabilidade de *Bifidobacterium* Bb-12, *Lb. plantarum* e *L. acidophilus* após a digestão in vitro da formulação BPA cozida estão apresentados na Figura 4, demonstrando que houve diferença significativa entre os probióticos ($P < 0.05$). Verificou-se que a *Bifidobacterium* Bb-12 apresentou contagem de 6.60 UFC log. g^{-1}, *Lb. plantarum* foi de 6.00 UFC log. g^{-1} e *L. acidophilus* de 6.53 UFC log. g^{-1} todos após a passagem pelo trato gastrointestinal, apresentando redução de ~ 1 UFC log. g^{-1} quando comparado ao produto cozido antes da digestão.

Fig. 4 Viabilidade das bactérias probióticas após o cozimento seguido da digestão *in vitro* da formulação BPA.



[a-b] Os valores médios com letras diferentes apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0.05$).

Hernández-alcántara, Wacher, Llamas, López, & Pérez-chabela (2018) ao avaliarem a resistência ao estresse intestinal observaram que algumas cepas de *Lb. plantarum* e *P. pentosaceus* mantiveram o mesmo nível de viabilidade ao longo de 240 min de incubação (cerca de 6 log UFC/mL), valores próximos ao desse estudo. Valero-Cases & José Frutos (2015) ao investigarem o efeito de diferentes métodos de

microencapsulação (extrusão e microencapsulação em emulsão interna) e da inulina na viabilidade de *Lactiplantibacillus plantarum* após os processos de digestão in vitro, obtiveram valores 7,40 e 6,53 UFC log. g^{-1} para os diferentes métodos de microencapsulação. O método de encapsulação é relevante no que diz respeito à sobrevivência do microrganismo ao processo digestivo, sendo que alguns estudos demonstraram essa proteção por parte de um meio de secagem por pulverização adequada (Schuck & Jeantet, 2017). Sendo assim, pode-se afirmar que o método de encapsulação utilizado nesse estudo influenciou positivamente para a sobrevivência das bactérias probióticas após a passagem pelo estresse intestinal.

Segundo Li et al. (2019), o probiótico precisa sobreviver à jornada da boca ao cólon após o consumo para poder exercer suas funções probióticas, resistindo ao ambiente de baixo pH (estômago) pelo período de aproximadamente 1 hora e à digestão da pepsina, além disso, deve ser tolerante aos fluidos intestinais, incluindo a enzima tripsina e também o pH neutro no trato gastrointestinal superior durante aproximadamente 2–6 horas. No presente trabalho foi evidenciada a sobrevivência dos probióticos após as condições gastrointestinais simuladas.

No futuro, análises devem ser realizadas para avaliar os aspectos sensoriais dos produtos desenvolvidos, assim como, análise de microestrutura eletrônica de varredura com o objetivo de visualizar as cepas probióticas inseridas na matriz cárnea.

4. Conclusão

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram ser possível o desenvolvimento de um produto cárneo funcional com aplicação de *Bifidobacterium animalis* ssp. *Lactis*, *Lactiplantibacillus plantarum* e *Lactobacillus acidophilus*. Os probióticos microencapsulados foram resistentes ao cozimento e a simulação da digestão gastrointestinal, mostrando ser uma alternativa para o desenvolvimento de

novos produtos que possuam condições adversas á essas bactérias. Acredita-se que o tratamento contendo as três cepas probióticas microencapsuladas (BPA) é a melhor estratégia para aplicação em hambúrgueres cozidos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pelo apoio a este projeto e a Chr. Hansen e a Danisco que forneceram os probióticos.

Referências

Alves, R. de A., de Sousa, A. M. B., Madeira, D. S. S., Santos, R. M., Pereira, A. L. F., Lemos, T. de O., & Abreu, V. K. G. (2020). Low-fat beef burgers containing fructooligosaccharides: Physicochemical properties, cooking characteristics, and sensory evaluation. *Journal of Food Processing and Preservation*, *44*(9), 1–9. https://doi.org/10.1111/jfpp.14649

American Meat Science Association, AMSA (2012). Meat color measurement guidelines. *American Meat Science Association: Champaign, IL*.

AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (17th ed.). Maryland: USA.

Araújo, R. De, Antonia, A., Brilhante, M., Samuel, D., Madeira, S., Moura, R., … Gonçalves, K. (2020). Low-fat beef burgers containing fructooligosaccharides : Physicochemical properties, cooking characteristics and sensory evaluation. *Journal of Food Processing and Preservation, 44(9).* https://doi.org/10.1111/jfpp.14649

Arief, I. I., Afiyah, D. N., Wulandari, Z., & Budiman, C. (2016). Physicochemical Properties, Fatty Acid Profiles, and Sensory Characteristics of Fermented Beef Sausage by Probiotics *Lactobacillus plantarum* IIA-2C12 or *Lactobacillus acidophilus* IIA-2B4. *Journal of Food Science*, *81*(11), M2761–M2769. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13509

Ben Slima, S., Ktari, N., Trabelsi, I., Triki, M., Feki-Tounsi, M., Moussa, H., … Ben Salah, R. (2017). Effect of partial replacement of nitrite with a novel probiotic *Lactobacillus plantarum* TN8 on color, physico-chemical, texture and microbiological properties of beef sausages. *LWT - Food Science and Technology*, *86*, 219–226. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.058

Ben Slima, S., Ktari, N., Triki, M., Trabelsi, I., Abdeslam, A., Moussa, H., … Ben Salah, R. (2018). Effects of probiotic strains, *Lactobacillus plantarum* TN8 and *Pediococcus acidilactici*, on microbiological and physico-chemical characteristics of beef sausages. *LWT - Food Science and Technology*, *92*, 195–203. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.038

Bis-souza, C. V., Lucia, A., Penna, B., & Carla, A. (2020a). Applicability of potentially probiotic *Lactobacillus casei* in low-fat Italian type salami with added fructooligosaccharides : in vitro screening and technological evaluation. *Meat Science*, *168*. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108186

Bis-Souza, C. V., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., Penna, A. L. B., & Barretto, A. C. S. (2019). New strategies for the development of innovative fermented meat products: a review regarding the incorporation of probiotics and dietary fibers. *Food Reviews International*, *35*(5), 467–484. https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1584816

Bis-souza, C. V, Pateiro, M., Domínguez, R., Penna, A. L. B., Lorenzo, J. M., & Silva,

A. C. (2020b). Impact of fructooligosaccharides and probiotic strains on the quality parameters of low-fat Spanish Salchichón. *Meat Science*, *159*. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107936

Blaiotta, G., Murru, N., Di Cerbo, A., Romano, R., & Aponte, M. (2018). Production of probiotic bovine salami using *Lactobacillus plantarum* 299v as adjunct. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *98*(6), 2285–2294. https://doi.org/10.1002/jsfa.8717

Bligh, E.G. and Dyer, W. J. (1959). Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*(8).

Bourne, M. . (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, *32*(7), 62–66.

BRASIL. . Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. Instrução Normativa nº 20, de 31 de Julho de 2000. Dispõe sobre os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Almôndega, de Apresuntado, de Fiambre, de Hambúrguer, de Quibe, de Presunto cozido e de Presunto. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 03 de agosto de 2000.

BRASIL. Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Dispõe sobre os métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

Bull, M., Plummer, S., Marchesi, J., & Mahenthiralingam, E. (2013). The life history of Lactobacillus acidophilus as a probiotic: a tale of revisionary taxonomy, misidentification and commercial success. FEMS Microbiol Letters, 349, 77–87.

https://doi.org/10.1111/1574-6968.12293

Casarotti, S. N., Carneiro, B. M., Todorov, S. D., Nero, L. A., Rahal, P., & Penna, A. L. B. (2017). In vitro assessment of safety and probiotic potential characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from water buffalo mozzarella cheese. *Annals of Microbiology*, *67*(4), 289–301. https://doi.org/10.1007/s13213-017-1258-2

Castro, J. M., Tornadijo, M. E., Fresno, J. M., & Sandoval, H. (2015). Biocheese: A food probiotic carrier. *BioMed Research International*, *2015*. https://doi.org/10.1155/2015/723056

Cavalheiro, C. P., Ruiz-Capillas, C., Herrero, A. M., Jiménez-Colmenero, F., Pintado, T., de Menezes, C. R., & Fries, L. L. M. (2019). Effect of different strategies of *Lactobacillus plantarum* incorporation in chorizo sausages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(15), 6706–6712. https://doi.org/10.1002/jsfa.9952

Coelho, S. R., Lima, Í. A., Martins, M. L., Benevenuto Júnior, A. A., Torres Filho, R. de A., Ramos, A. de L. S., & Ramos, E. M. (2019). Application of *Lactobacillus paracasei* LPC02 and lactulose as a potential symbiotic system in the manufacture of dry-fermented sausage. *LWT - Food Science and Technology*, *102*, 254–259. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.045

Correa, V. G., Gonçalves, G. A., de Sá-Nakanishi, A. B., Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Dias, M. I., … Peralta, R. M. (2017). Effects of in vitro digestion and in vitro colonic fermentation on stability and functional properties of yerba mate (Ilex paraguariensis A. St. Hil.) beverages. *Food Chemistry*, *237*, 453–460. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.125

Duranti, S., Vivo, V., Zini, I., Milani, C., Mangifesta, M., Anzalone, R., … Turroni, F.

(2018). *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 alleviates intestinal ischemia/reperfusion injury. *PLoS ONE* , *13*(8), 1–16. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202670

Goldin, B. R., & Gorbach, S. L. (2008). Clinical Indications for Probiotics: An Overview. *Clinical Infectious Diseases*, *46*(2), 96–100. https://doi.org/10.1086/523333

Heck, R. T., Vendruscolo, R. G., de Araújo Etchepare, M., Cichoski, A. J., de Menezes, C. R., Barin, J. S., … Campagnol, P. C. B. (2017). Is it possible to produce a low-fat burger with a healthy n − 6/n − 3 PUFA ratio without affecting the technological and sensory properties? *Meat Science*, *130*, 16–25. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.03.010

Hernández-alcántara, A. M., Wacher, C., Llamas, M. G., López, P., & Pérez-chabela, M. L. (2018). Probiotic properties and stress response of thermotolerant lactic acid bacteria isolated from cooked meat products. *LWT - Food Science and Technology*, *91*, 249–257. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.063

Horackova, S., Vesela, K., Klojdova, I., Bercikova, M., & Plockova, M. (2020). Bile salt hydrolase activity , growth characteristics and surface properties in *Lactobacillus acidophilus*. *European Food Research and Technology*, *246*(8), 1627–1636. https://doi.org/10.1007/s00217-020-03518-8

Jafari, M., Mortazavian, A. M., Hosseini, H., Safaei, F., Mousavi Khaneghah, A., & Sant'Ana, A. S. (2017). Probiotic *Bacillus*: Fate during sausage processing and storage and influence of different culturing conditions on recovery of their spores. *Food Research International*, *95*, 46–51. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.001

Kaur, I. P., Kuhad, A., Garg, A., & Chopra, K. (2009). Probiotics: Delineation of prophylactic and therapeutic benefits. *Journal of Medicinal Food*, *12*(2), 219–235. https://doi.org/10.1089/jmf.2007.0544

Khalili, S., & Javad, S. (2019). Anti-listeria activity and shelf life extension effects of *Lactobacillus* along with garlic extract in ground beef. *Journal of Food Safety, 39(6)*. https://doi.org/10.1111/jfs.12709

Khan, M. I., Arshad, M. S., Anjum, F. M., Sameen, A., & Gill, W. T. (2011). Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages. *Food Research International*, *44*(10), 3125–3133. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.033

Leygonie, C., Britz, T. J., & Hoffman, L. C. (2012). Impact of freezing and thawing on the quality of meat : Review. *Meat Science*, *91*(2), 93–98. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.01.013

Li, E., Yang, H., Zou, Y., Wang, H., Hu, T., Li, Q., & Liao, S. (2019). In-vitro digestion by simulated gastrointestinal juices of *Lactobacillus rhamnosus* cultured with mulberry oligosaccharides and subsequent fermentation with human fecal inocula. *LWT - Food Science and Technology*, *101*, 61–68. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.029

Lopes, L. A. A., Pimentel, T. C., Carvalho, R. de S. F., Madruga, M. S., Galvão, M. de S., Bezerra, T. K. A., … Stamford, T. C. M. (2021). Spreadable goat Ricotta cheese added with *Lactobacillus acidophilus* La-05: Can microencapsulation improve the probiotic survival and the quality parameters? *Food Chemistry*, *346*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128769

Mao, L., Pan, Q., Yuan, F., & Gao, Y. (2019). Formation of soy protein isolate-

carrageenan complex coacervates for improved viability of *Bifidobacterium longum* during pasteurization and in vitro digestion. *Food Chemistry*, *276*, 307–314. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.026

Ningtyas, D. W., Bhandari, B., Bansal, N., & Prakash, S. (2019). The viability of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* (non-encapsulated and encapsulated) in functional reduced-fat cream cheese and its textural properties during storage. *Food Control*, *100*, 8–16. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.048

Nualkaekul, S., Lenton, D., Cook, M. T., Khutoryanskiy, V. V, & Charalampopoulos, D. (2012). Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. *Carbohydrate Polymers*, *90*(3). 1281–1287. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.073

Patinho, I., Mabel, M., Saldaña, E., Clara, A., Bortoluzzi, T., Rios-mera, J. D., … Contreras-castillo, C. J. (2021). Agaricus bisporus mushroom as partial fat replacer improves the sensory quality maintaining the instrumental characteristics of beef burger. *Meat Science*, *172*. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108307

Pavli, F. G., Argyri, A. A., Chorianopoulos, N. G., Nychas, G. J. E., & Tassou, C. C. (2020). Effect of *Lactobacillus plantarum* L125 strain with probiotic potential on physicochemical, microbiological and sensorial characteristics of dry-fermented sausages. *LWT - Food Science and Technology , 118*. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108810

Pavli, F. G., Kovaiou, I., Apostolakopoulou, G., Kapetanakou, A., Skandamis, P., Nychas, G. J. E., … Chorianopoulos, N. (2017). Alginate-based edible films delivering probiotic bacteria to sliced ham pretreated with high pressure processing. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(9).

https://doi.org/10.3390/ijms18091867

Pérez-Chabela, M. L., Lara-Labastida, R., Rodriguez-Huezo, E., & Totosaus, A. (2013). Effect of Spray Drying Encapsulation of Thermotolerant Lactic Acid Bacteria on Meat Batters Properties. *Food and Bioprocess Technology*, *6*(6), 1505–1515. https://doi.org/10.1007/s11947-012-0865-y

Polizer-Rocha, Y. J., Lorenzo, J. M., Pompeu, D., Rodrigues, I., Baldin, J. C., Pires, M. A., … Trindade, M. A. (2020). Physicochemical and technological properties of beef burger as influenced by the addition of pea fibre. *International Journal of Food Science and Technology*, *55*(3), 1018–1024. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ijfs.14324

Prado, M. E. A., Queiroz, V. A. V., Correia, V. T. da V., Neves, E. O., Roncheti, E. F. S., Gonçalves, A. C. A., … de Oliveira, F. C. E. (2019). Physicochemical and sensorial characteristics of beef burgers with added tannin and tannin-free whole sorghum flours as isolated soy protein replacer. *Meat Science, 150,* 93-100. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.12.006

R Core Team. (2016). R: A language and environment for statistical computing. *Vienna: R Foundation for Statistical Computing*.

Ribeiro, W. O., Ozaki, M. M., Santos, M., Rodríguez, A. P., Pflanzer, B., Aparecida, M., & Pollonio, R. (2021). Interaction between papain and transglutaminase enzymes on the textural softening of burgers. *Meat Science, 174*. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108421

Rubio, R., Aymerich, T., Bover-cid, S., Guàrdia, M. D., Arnau, J., & Garriga, M. (2013). Probiotic strains *Lactobacillus plantarum* 299V and *Lactobacillus*

rhamnosus GG as starter cultures for fermented sausages. *LWT - Food Science and Technology*, *54*(1), 51–56. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.014

Salueña, B. H., Gamasa, C. S., Manuel, J., & Rubial, D. (2019). CIELAB color paths during meat shelf life. *Meat Science*, *157*. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107889

Schuck, P., & Jeantet, R. (2017). Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria : A review. *Trends in Food Science & Technology*, *63*, 1-17. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.007

Seddik, H. A., Bendali, F., Gancel, F., Fliss, I., Spano, G., & Drider, D. (2017). *Lactobacillus plantarum* and Its Probiotic and Food Potentialities. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *9*(2), 111–122. https://doi.org/10.1007/s12602-017-9264-z

Shah, N. P. (2000). Probiotic Bacteria : Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *Journal of Dairy Science*, *83*(4), 894–907. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74953-8

Sharma, H., Mendiratta, S. K., Agrawal, R. K., Gurunathan, K., Kumar, S., & Singh, T. P. (2017). Use of various essential oils as bio preservatives and their effect on the quality of vacuum packaged fresh chicken sausages under frozen conditions. *LWT - Food Science and Technology*, *81*, 118–127. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.048

Song, M. Y., Van-Ba, H., Park, W. S., Yoo, J. Y., Kang, H. B., Kim, J. H., … Ham, J. S. (2018). Quality characteristics of functional fermented sausages added with encapsulated probiotic *Bifidobacterium longum* KACC 91563. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, *38*(5), 981–994.

https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.e30

Soni, R., Jain, N. K., Shah, V., Soni, J., Suthar, D., & Gohel, P. (2020). Development of probiotic yogurt: effect of strain combination on nutritional, rheological, organoleptic and probiotic properties. *Journal of Food Science and Technology*, *57*(6), 2038–2050. https://doi.org/10.1007/s13197-020-04238-3

Subtil, N., Ferreira, D. O., Rosset, M., Lima, G., Maria, P., Campelo, S., … Macedo, F. De. (2019). Effect of adding Brosimum gaudichaudii and Pyrostegia venusta hydroalcoholic extracts on the oxidative stability of beef burgers. *LWT - Food Science and Technology*, *108*, 145–152. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.041

Trabelsi, I., Ben Slima, S., Ktari, N., Triki, M., Abdehedi, R., Abaza, W., … Ben Salah, R. (2019). Incorporation of probiotic strain in raw minced beef meat: Study of textural modification, lipid and protein oxidation and color parameters during refrigerated storage. *Meat Science*, *154*, 29–36. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.04.005

Valero-Cases, E., Cerdá-Bernad, D., Pastor, J. J., & Frutos, M. J. (2020). Non-dairy fermented beverages as potential carriers to ensure probiotics, prebiotics, and bioactive compounds arrival to the gut and their health benefits. Nutrients, 12(6). https://doi.org/10.3390/nu12061666

Valero-Cases, E., & José Frutos, M. (2015). LWT - Food Science and Technology Effect of different types of encapsulation on the survival of *Lactobacillus plantarum* during storage with inulin and in vitro digestion. *LWT - Food Science and Technology*, *64*, 824–828. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.049

Wang, B., Pace, R. D., Dessai, A. P., Bovell-Benjamin, A., & Phillips, B. (2002).

Modified extraction method for determining 2-thiobarbituric acid values in meat with increased specificity and simplicity. *Journal of Food Science*, *67*(80), 2833–2836. https://doi.org/Doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb08824.x

Wang, Z., He, Z., Gan, X., & Li, H. (2018). Interrelationship among ferrous myoglobin , lipid and protein oxidations in rabbit meat during refrigerated and superchilled storage. *Meat Science*, *146*(2), 131–139. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.08.006

Yadav, A. S. (2017). LWT - Food Science and Technology Antioxidant and antimicrobial profile of chicken sausages prepared after fermentation of minced chicken meat with *Lactobacillus plantarum* and with additional dextrose and starch. *LWT - Food Science and Technology*, *77*, 249–258. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.050

Zhang, Y., Holman, B. W. B., Ponnampalam, E. N., Kerr, M. G., Bailes, K. L., Kilgannon, A. K., … Hopkins, D. L. (2019). Understanding beef flavour and overall liking traits using two different methods for determination of thiobarbituric acid reactive substance. *Meat Science*, *149*, 114–119. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.11.018