UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*,
microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por
spray drying e leite de jorro**

ALESSANDRA CRISTINA OLIVEIRA

Ribeirão Preto
2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*,
microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por
spray drying e leite de jorro**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientada: Alessandra Cristina Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo de Freitas

Ribeirão Preto
2006

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Alessandra Cristina

Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por *spray drying* e leito de jorro. Ribeirão Preto, 2006.

77p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP-Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Freitas, Osvaldo de.

1. Microencapsulação 2. Probióticos 3. *Spray drying* 4. Leito de Jorro.

Alessandra Cristina Oliveira

Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por *spray drying* e leite de jorro

Banca Examinadora

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Trabalho defendido e aprovado pela comissão julgadora em ____/____/2006.

*“A vida é assim: esquentar e esfriar,
apertar e depois afrouxar,
sossegar e depois desinquietar.*

O que ela quer de nós é CORAGEM.”

Guimarães Rosa (Grande Sertão: Veredas).

Dedico este trabalho:

Ao meu pai, Jurandir “meu Padura”, admirável pelo seu caráter e inteligência. Um dos grandes responsáveis pelas minhas conquistas. Obrigada pelo amor e dedicação em prol de mais este sonho.

A minha mãe, Gilda, uma mulher batalhadora.

Suas palavras de incentivo e conforto, muitas vezes por telefone, me fortalecia para continuar a jornada. Obrigada por me proporcionar todas as ferramentas possíveis para realização de mais esta etapa da minha vida.

Ao meu irmão Cláudio “Catiau”, pelo carinho e cuidados dispensados à irmã caçula.

Ao meu irmão Sérgio, um exemplo de profissionalismo e ser humano. Seu amor, companheirismo, incentivo foi imprescindível nesta jornada da minha vida.

Ao Milton, que tanto me faz feliz, pelo amor, carinho e paciência. Nos momentos difíceis soube, com sabedoria, me apoiar.

Sem vocês tenho certeza que não teria conseguido, obrigada.

Agradecimentos

A Deus, que guia os meus passos por diversos caminhos, muitas vezes considerados por mim intransponíveis, mas que estando presente em todos os momentos de minha vida, concede-me força para vencer todos os obstáculos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Osvaldo de Freitas que confiou e sempre procurou, sem ao menos questionar o motivo, ajudar-me indiscutivelmente. Minha gratidão é pequena tamanha sua importância em minha vida. A você, expresso meu maior agradecimento.

A Moninha (Mônica), Pulinha (Maria Paula) e Ric (Ricardo), meus bons amigos. Vocês são responsáveis por esta conquista, nossa amizade é um sentimento que o tempo nunca vai apagar. Obrigada pela paciência em me ajudar e pelas valiosas conversas.

A Camila Areda, o “Cerimonial de entrada na pós-graduação” será inesquecível!

A Camila Redigueri, obrigada pelo carinho e por ser uma pessoa tão prestativa.

A Carolina Redigueri, obrigada pelo acolhimento quando cheguei no Laboratório.

A Priscila, com quem aprendi a enfrentar os obstáculos de forma tranqüila, e que tranqüilidade!

A Renata, pela atenção e cuidados durante o período em que moramos juntos.

As alunas de Iniciação Científica, Flavinha (Flávia), Vânia, Lulu (Luciana), Rosiane que são um exemplo de compromisso com o trabalho.

A Cris (Cristiane Correia), por sua amizade e por dividir comigo os momentos de alegria e tensão.

A Nathali, Katyana, Maíra, Maurício, Adriana, Bruna Altóe, Cristiane Bregge, Toni Carvalho, Marcos, Alexandre.

As companheiras do PAE, Sthepânia, Daniela e Aline Carollo.

As alunas do Laboratório de Produtos Funcionais da FZEA-USP, Talita, Patrícia e em especial a Camila Boshini pela disponibilidade constante em me ajudar nos experimentos e pela amizade. Sem esta parceria, certamente, este trabalho não teria o mesmo brilho que representa hoje para mim.

Aos meus vizinhos Ricardo (“High-tech”) e Paula pela amizade e companheirismo.

A professora Dra. Julieta Ueta da FCFRP-USP, agradeço a receptividade em seu laboratório e pelas valiosas contribuições no exame de qualificação.

Ao professor Dr. Júlio Baliero da FZEA-USP, agradeço a contribuição referente à análise estatística deste trabalho.

Ao técnico Fernando César Nonato Fernandes do Laboratório de Tecnologia de Fermentação e Assistência Farmacêutica da FCFRP-USP, pela amizade e atenção no atendimento de minhas solicitações.

Ao técnico José Maria Puga, meu amigo de todas as horas. Obrigada por proporcionar as melhores condições para a realização deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório, Paulo Carvalho, Flávia Caldas, Franklin Thomazini, Eduardo.

A todas as demais pessoas que, de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho e com a minha formação científica, meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Histórico de Probióticos	19
A. Gênero <i>Lactobacillus</i>	20
B. Gênero <i>Bifidobacterium</i>	20
1.2. Atividades terapêuticas	21
1.3. Legislação	23
1.4. Requisitos indispensáveis dos probióticos	23
1.5. Microencapsulação	25
1.5.1. Coacervação	27
1.6. <i>Spray drying</i>	29
1.7. Leito de Jorro.....	31
2. OBJETIVOS	34
2.1. Objetivo Geral	34
2.2. Objetivos Específicos.....	34
3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	36
3.1. Materiais	36
3.2. Métodos	36
3.2.1. Preparação das microcápsulas	36
3.2.2. Secagem das microcápsulas por <i>spray drying</i>	37
3.2.3. Secagem das microcápsulas em leito de jorro com partículas inertes	38
3.2.4. Avaliação do teor de umidade das microcápsulas.....	41
3.2.5. Avaliação da resistência de <i>B. lactis</i> e <i>L. acidophilus</i> aos processos de secagem em <i>spray dryer</i> e leito de Jorro	41
3.2.6. Avaliação “in vitro” da sobrevivência de <i>L. acidophilus</i> e <i>B. lactis</i> em pH 1 e 3	42
3.2.7. Estabilidade dos microrganismos encapsulados durante a estocagem (<i>Shelf life</i> das microcápsulas)	42
3.2.8. Caracterização morfológica das microcápsulas contendo probióticos por Microscopia Ótica e por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	42
3.2.9. Análise estatística.....	43

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. Avaliação da resistência de <i>B. lactis</i> e <i>L. acidophilus</i> aos processos de secagem	45
4.2. Avaliação do teor de umidade das microcápsulas	49
4.3. Avaliação da sobrevivência dos <i>L. acidophilus</i> e <i>B. lactis</i> livres e microencapsulados, secos em <i>spray dryer</i> , frente ao pH 1 e 3	50
4.4. Avaliação da sobrevivência dos <i>L. acidophilus</i> e <i>B. lactis</i> livres e microencapsulados, secos em leite de jorro, frente ao pH 1 e 3	54
4.5. Estabilidade das microcápsulas, secas em <i>spray dryer</i> , durante a estocagem (<i>Shelf life</i> das microcápsulas contendo <i>L. acidophilus</i> e <i>B. lactis</i>)	56
4.5.1. Estabilidade das microcápsulas, secas em leite de jorro, durante a estocagem (<i>Shelf life</i> das microcápsulas contendo <i>L. acidophilus</i> e <i>B. lactis</i>)	59
4.6. Caracterização morfológica das microcápsulas contendo probióticos por Microscopia Ótica	61
4.6.1. Caracterização morfológica das microcápsulas contendo probióticos por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	63
5. CONCLUSÕES	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático do <i>spray dryer</i>	37
Figura 2. Diagrama esquemático do Leite de Jorro Convencional	39
Figura 3. Avaliação da resistência de <i>L. acidophilus</i> e <i>B. lactis</i> ao processo de secagem em <i>spray dryer</i>	48
Figura 4. Avaliação da resistência de <i>L. acidophilus</i> e <i>B. lactis</i> ao processo de secagem em leite de jorro.....	48
Figura 5. Efeito do pH na sobrevivência de <i>L. acidophilus</i> livres e microencapsulados, secos em <i>spray dryer</i>	53
Figura 6. Efeito do pH na sobrevivência de <i>B. lactis</i> livres e microencapsulados, secos em <i>spray dryer</i>	53
Figura 7. Efeito do pH na sobrevivência de <i>L. acidophilus</i> livres e microencapsulados, secos em leite de jorro.....	55
Figura 8. Efeito do pH na sobrevivência de <i>B. lactis</i> livres e microencapsulados, secos em leite de jorro.....	56
Figura 9. Fotomicrografias óticas das microcápsulas de pectina e caseína “in natura” em pH 8,0	62
Figura 10. Fotomicrografias óticas das microcápsulas de pectina e caseína após secagem por <i>spray drying</i>	62

Figura 11. Fotomicrografias óticas das microcápsulas de pectina e caseína após secagem em leite de jorro.....	63
Figura 12. Fotomicrografias obtidas por MEV das microcápsulas de pectina e caseína após secagem em <i>spray dryer</i>	63
Figura 13. Fotomicrografias obtidas por MEV das microcápsulas de pectina e caseína após secagem em leite de jorro.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições operacionais utilizadas na secagem das microcápsulas de pectina e caseína, contendo <i>B. lactis</i> e <i>L. acidophilus</i> em <i>spray dryer</i>	38
Tabela 2.. Características do material inerte.....	40
Tabela 3. Condições operacionais utilizadas na secagem das microcápsulas de pectina e caseína, contendo <i>L. acidophilus</i> e <i>B. lactis</i> em leite de jorro.....	40
Tabela 4. Estabilidade das microcápsulas contendo microrganismos, secas em <i>spray dryer</i> , durante a estocagem a 7 e 37°C.....	58
Tabela 5. Estabilidade das microcápsulas contendo microrganismos, secas em leite de jorro, durante a estocagem a 7 e 37°C.....	61

RESUMO

OLIVEIRA, A. C. **Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por *spray drying* e leite de Jorro.** 2006, 77p. Dissertação Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

No presente trabalho microcápsulas contendo *B. lactis* (BI 01) e *L. acidophilus* (LAC 4) foram produzidas por coacervação complexa, utilizando pectina e caseína como agente encapsulante e posteriormente foram desidratadas em *spray dryer* e leite de Jorro. Este estudo avaliou a resistência desses microrganismos aos processos de secagem, de estocagem (120 dias a 7 e 37°C) e a tolerância “in vitro” quando inoculados em soluções de pHs ácidos (pH 1.0 e 3.0), além da morfologia das microcápsulas por Microscopia ótica e eletrônica de varredura. Após a secagem em *spray dryer* foi verificada a integridade celular da maioria da população, porém, *L. acidophilus* foi mais resistente às condições utilizadas do que *B. lactis*. A secagem em leite de jorro também foi promissora, uma vez que manteve a viabilidade celular da maioria da população de probióticos. *L. acidophilus* microencapsulados e secos por *spray dryer* mantiveram a viabilidade por um período de estocagem maior do que *B. lactis*. A vida útil do *L. acidophilus* microencapsulados e secos em leite de jorro é maior quando armazenado em temperaturas mais baixas (7° C). No entanto *B. lactis* microencapsulados e secos em leite de jorro perdem sua viabilidade durante o armazenamento em ambas as temperaturas (7 e 37° C). O resultado obtido no teste, que consistia em avaliar o efeito do pH sob *Lactobacillus acidophilus* e *B. lactis*, permitiu inferir que quando estes microrganismos microencapsulados foram secos por *spray dryer* se mostraram mais resistentes às condições ácidas do que os não encapsulados. Entretanto, as microcápsulas quando secas em leite de jorro, não

foram eficientes para prover proteção aos *L. acidophilus* e *B. lactis* em pHs similares ao do estômago humano. A microscopia eletrônica de varredura confirmou que as partículas secas em *spray dryer* apresentaram formato esférico, sem presença de fissuras e as partículas secas em leite de jorro, formatos irregulares.

ABSTRACT

OLIVEIRA, A. C. **Viability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* by coacervation, followed by spray drying and spouted bed.** 2006, 77f. Master (Dissertation) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

In this present work, microcapsules containing *B. lactis* or *L. acidophilus* were produced by complex coacervation based on pectin and casein interactions. After coacervation the systems were dehydrated by *spray drying* or spouted bed techniques. In this present study could evaluate the resistance of these microorganisms to dehydration process, *shelf life* (storage at 7 and 37 °C for 120 days), and their *in vitro* tolerance after being inoculated in acid solutions (pH 1.0 and 3.0). Moreover the morphology characteristics were analyzed by optical microscopic and scanning electron microscopic. Both systems maintained their cellular integrity after *spray drying*, although, *L. acidophilus* microcapsules were more resistant. Spouted bed drying was also promising, once the microorganism still remains viable. Comparing the results about *shelf life*, it is noticeable that *L. acidophilus* microcapsules dehydrated by spray dried maintained viability for storage period greater than *B. lactis*. When the microcapsules were dehydrated by spouted bed, the *L. acidophilus* obtained higher viability at 7°C stored temperature. In contrast, *B. lactis* lose their viability during storage at both temperatures (7 and 37°C). The *in vitro* studies showed that the microorganisms encapsulated, dehydrated by spray dried, were more resistance to acid pH conditions than free ones. Furthermore, microcapsules when dried in spouted bed were not efficient to provide protection to both microorganisms at this pH's values. The scanning electron microscopic showed

that the particles obtained by *spray dryer* were spherical without cracks, and the particles obtained by spouted bed presented irregular shape.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Histórico de Probióticos

Estudos recentes têm demonstrado que as pessoas estão mais conscientes da relação entre dieta e o desenvolvimento de doenças e que os alimentos podem contribuir na prevenção de várias delas, os quais são denominados alimentos funcionais (Hollingsworth, 1997). São considerados alimentos funcionais, aqueles que, além de contribuírem para a manutenção do equilíbrio bioquímico-fisiológico (nutrição básica), possuem componentes fisiologicamente ativos (Sanders, 1998). Dentre a grande variedade de alimentos funcionais, considerável atenção tem sido dada às bactérias probióticas e produtos que as contêm.

O termo probiótico é de origem grega e significa “para a vida”. Tal termo foi inicialmente proposto por Lilly e Stillwell (1965), para descrever compostos ou extratos de tecidos capazes de estimular o crescimento microbiano. Posteriormente Parker (1974), o redefiniu como “organismos e/ou substâncias que contribuem no equilíbrio da microbiota intestinal”. Esta definição era, no entanto, pouco satisfatória uma vez que a palavra substância poderia incluir suplementos tais como antibióticos. Várias modificações da definição do termo probiótico foram propostas, porém ainda não existe um consenso, sendo a mais aceita a que considera os probióticos como “microrganismos vivos, que após a ingestão em quantidade suficiente, desempenham, no hospedeiro, um efeito benéfico adicional para a saúde, além da nutrição básica, por melhorar e manter o equilíbrio da microbiota intestinal” (Sanders, 1999 e Fuller, 1989).

Os microrganismos mais utilizados, como probióticos, em produtos destinados ao consumo humano são os *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidum* e *Saccharomyces boulardii* (Playne, 1994).

A. Gênero *Lactobacillus*

O *Lactobacillus acidophilus* é um microrganismo probiótico que vem sendo intensivamente estudado e já conta com algumas aplicações na indústria alimentícia. Trata-se de um microrganismo que habita o trato intestinal de humanos e animais: apresentam-se como bastonetes isolados ou em cadeias curtas. São desprovidos de flagelos, e incapazes de formar esporos. Algumas cepas produzem H_2O_2 e bacteriocinas. Seu crescimento ótimo ocorre em temperatura entre 37° a 41°C e em pH entre 6 e 7. O crescimento pode ser inibido em valores de pH abaixo de 4,5 ou acima de 9,5 e a taxa de crescimento é minimizada em temperaturas em torno de 25 a 28°C. Estes microrganismos são homofermentativos, ou seja, realizam a fermentação e produzem ácido láctico a partir da lactose (Laroia et al., 1991).

B. Gênero *Bifidobacterium*

As Bifidobactérias foram isoladas e descritas pela primeira vez no final do século XIX por Tissier, que as denominou *Bacillus bifidus*. São microrganismos gram-positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, catalase-negativos e anaeróbicos (algumas cepas são tolerantes à presença de O_2). Não produzem H_2O_2 e bacteriocinas. Possuem morfologia variada, incluindo bacilos curtos, curvados e bifurcados em forma de Y. O crescimento ótimo ocorre à temperatura de 35 – 40°C e valores de pH de 5,5 a 6,0 (Sgorbati et al., 1995).

As bifidobactérias são heterofermentativos e os principais produtos da fermentação são ácidos acético e lático, mas também produzem ácido fórmico, succínico, acetaldeído, acetona, acetoína e diacetil. A utilização de açúcares varia entre as espécies, sendo que *Bifidobacterium bifidum* fermentam apenas quatro carboidratos, enquanto *Bifidobacterium adolescentis* podem fermentar dezenove (Laroia e Martin, 1990).

1.2. Atividades terapêuticas

O consumo de probióticos tem proporcionado inúmeros benefícios à saúde humana. Um dos mecanismos de ação proposto para explicar o efeito benéfico dos probióticos é a exclusão competitiva, aderindo a sítios específicos localizados no epitélio intestinal, diminuindo, desta forma, a colonização por microrganismos patogênicos (Ferreira; Kussakawa, 1999).

As bactérias probióticas previnem infecções urogenitais por patógenos tais como *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides bivius*, *Candida albicans* e *Chlamydia trachomatis*. Estudos têm relacionado a produção de peróxido de hidrogênio pelos lactobacilos com a redução na incidência de infecções vaginais (O'Sullivan et al., 1992).

Salminen (1999) relatou que o consumo de produtos contendo probióticos diminuiu a recorrência de infecções por Cândida.

Outro benefício terapêutico atribuído às bactérias probióticas consiste na atividade antimicrobiana, sendo que lactobacilos atuam através da produção de ácido lático, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas enquanto bifidobactérias exercem esta atividade através da produção de ácido lático e acético já que não produzem peróxido, nem bacteriocinas. Estes ácidos provocam uma redução no pH

intestinal, tornando o meio impróprio para o crescimento de muitos patógenos (Modler et al., 1990).

Alguns estudos têm demonstrado a efetividade de probióticos nos processos carcinogênicos. Gomes et al., (1999), mostraram que algumas linhagens de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus acidophilus* são capazes de reduzir a concentração de enzimas responsáveis pela ativação de alguns pró-carcinógenos e, conseqüentemente, diminuir o risco de desenvolvimento de tumores. Alguns mecanismos de ação foram propostos para explicar estes efeitos, tais como a redução das enzimas produzidas por bactérias fecais, as quais catalisam, no cólon, a conversão de aminas pró-carcinogênicas em carcinogênicas e estimulação do sistema imunológico (O'Sullivan et al., 1992).

A intolerância à lactose pode ter etiologia congênita da enzima β -galactosidase na mucosa intestinal ou a redução da atividade da lactase durante as desordens intestinais, tais como gastroenterite. A ausência desta enzima faz com que o indivíduo sofra uma série de desconfortos abdominais, como por exemplo, flatulência, dores abdominais e diarreia (O' Sullivan et al., 1992). *Lactobacillus acidophilus* e bifidobactérias produzem a enzima β -galactosidase, a qual hidrolisa a lactose, melhorando a intolerância a este açúcar (Kailasapathy; Rybya, 1997).

Estudos clínicos têm relacionado à diminuição nos níveis de colesterol sérico com o consumo de leites fermentados. Apesar desta atividade terapêutica ser muito polêmica, alguns mecanismos de ação têm sido propostos. Dentre eles podemos citar a presença, em leites fermentados, de ácidos orgânicos, tais como ácido úrico, ácido orótico e ácido hidroximetilglutárico, os quais inibem a síntese do colesterol; as bactérias ácido lácticas produzem hidroximetilglutarato-CoA que inibe a

hidroximetilglutaril-CoA redutase, que está envolvida na síntese do colesterol (O'Sullivan et al., 1992).

Visto que as bactérias probióticas desempenham um papel importante na promoção e manutenção da saúde, muitas indústrias e pesquisadores têm demonstrado grandes interesses em incorporá-las em produtos alimentícios e farmacêuticos (Gardner et al., 2000).

1.3. Legislação

A legislação de probióticos diverge bastante entre os países. O primeiro país a regularizar a categoria dos alimentos funcionais foi o Japão, em 1980, recebendo o nome de “Foods for Specified Health Use” (FOSHU). A legislação japonesa define FOSHU como alimentos processados que além de serem nutritivos auxiliam as funções fisiológicas, dentre os quais podemos citar as bactérias ácido lácticas, sendo que o padrão para a contagem mínima destas bactérias em alimentos lácteos neste país deve ser de pelo menos 10^7 UFC/ml (Shortt, 1999).

No Brasil, uma resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o “Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e/ou de Saúde”, diz que nos casos dos probióticos, deve constar no rótulo a quantidade dos microrganismos viáveis que garantam a ação alegada dentro do prazo de validade do produto (ANVISA, 2002).

1.4. Requisitos indispensáveis dos probióticos

Para os probióticos exercerem os efeitos deles esperados, alguns aspectos devem ser considerados: permanecerem viáveis no produto até o momento do consumo; serem capazes de sobreviver à passagem pelo TGIS (suco gástrico e sais

biliares intestinais); serem capazes de aderir à superfície da mucosa intestinal; manter a atividade antagonista contra microrganismos patogênicos, tais como *Helicobacter pylori*, *Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes* e *Clostridium difficile*; serem metabolicamente ativos e produzir efeitos benéficos enquanto estiverem no intestino (Kim et al., 1988; Mattila-Sandholm et al., 2002).

A tolerância dos probióticos as condições de pH ácido, presença de sais biliares e oxigênio variam entre as espécies. *Lactobacillus acidophilus* mostrou-se mais resistente ao pH entre 3,9 e 4,6 que *Bifidobacterium* (Laroia; Martin, 1991), porém este último foi mais resistente à presença de sais biliares (Clark; Martin, 1994).

Assim, o sucesso de produtos contendo probióticos depende não somente de suas propriedades como promotores de saúde, mas também da viabilidade da bactéria probiótica durante o período de vida útil do produto, bem como da resistência da bactéria às condições do trato gastrointestinal superior (TGIS).

Várias técnicas têm sido empregadas com o propósito de prover formas convenientes destas bactérias para estocagem e aplicação no desenvolvimento de produtos alimentícios e farmacêuticos, mantendo a sobrevivência dos probióticos durante a vida útil do produto. Uma das estratégias é a secagem em *spray dryer* de culturas com alta concentração de microrganismos (Silva et al., 2002), porém a maior limitação do *spray dryer* em culturas de probióticos é a perda da viabilidade durante o processamento e estocagem do pó, a qual depende de vários fatores, incluindo a espécie e cepa utilizada, condições do processo de secagem, pré-adaptação ou não às condições de estresse (Desmond et al., 2002).

A encapsulação vem sendo avaliada na indústria de alimentos probióticos, como meio de proteger as células vivas de extremos de calor e umidade (O’Riordan

et al., 2001). Várias técnicas têm sido utilizadas para obter cápsulas contendo culturas de probióticos, incluindo imobilização em “beads” de alginato de cálcio (Lee et al., 2000) e microencapsulação em *spray dryer* (Favaro-Trindade et al., 2002). Todas estas técnicas apresentam variado grau de sucesso, dependendo da cultura de bactéria e processamento tecnológico envolvido, no entanto, a microencapsulação tem se mostrado bastante promissora.

1.5. Microencapsulação

A tecnologia de microencapsulação tem sido amplamente utilizada em muitas áreas, tais como: gráfica, alimentícia, agrícola e em produtos técnicos e domésticos. Sua aplicação na área farmacêutica e médica tem sido bastante estudada, particularmente para a encapsulação de fármacos instáveis e irritantes ou na preparação de sistemas de liberação (Shahidi, 1993; Cho et al., 2001; Sandor et al., 2001).

Através do processo de microencapsulação é possível converter líquidos em sólidos; mascarar odor e sabor; alterar propriedades de colóides e de superfície; proteger fármacos das condições ambientais e do trato gastrointestinal; melhorar estabilidade de fármacos; modular características de liberação e proporcionar liberação sítio específica (Bakan et al., 2001; Nadian et al., 2002; Shi et al., 2002).

Na área alimentícia tem sido uma alternativa viável para resolver os problemas de instabilidade e inviabilidade dos probióticos, além de possibilitar novas aplicações (Sultana et al., 2000; Favaro-Trindade; Grosso, 2000, 2002; Cui et al., 2000; O’Riordan et al., 2001).

A singularidade da microencapsulação é o revestimento de partículas muito pequenas e a possibilidade de utilização destas em ampla variedade de formas e produtos.

Alguns aspectos básicos devem ser considerados no desenvolvimento de sistemas microencapsulados tais como: natureza, estabilidade do material a ser encapsulado; características do polímero encapsulador; processo de microencapsulação e características do produto a ser obtido.

Diversos materiais de parede podem ser utilizados na microencapsulação. Estes materiais podem ser de origem natural, semi-sintética, sintética, biodegradáveis ou não, no qual podemos citar, a goma arábica, alginato, os carboidratos, amido, maltodextrina, proteínas, caseína, gelatina, derivados de celulose, carboximetilcelulose, etilcelulose e os polímeros derivados do ácido acrílico e metacrílico (Jackson; Lee, 1991). O polímero encapsulador deve ser capaz de formar um filme que seja coesivo com o material a ser encapsulado, quimicamente compatível, que não reaja com o núcleo e que ofereça desejáveis propriedades de revestimento, tais como: resistência, flexibilidade, impermeabilidade e estabilidade (Donbrow, 1992). A escolha dos solventes é determinada não apenas pela solubilidade e estabilidade do polímero, mas, também pela compatibilidade com o material a ser encapsulado. Muitos polímeros requerem a utilização de solventes orgânicos, o que impede o seu uso na encapsulação de organismos vivos. Este inconveniente tem despertado o interesse no desenvolvimento e utilização de polímeros passíveis de serem utilizados em meio aquoso especialmente para a encapsulação de microrganismos (Favaro-Trindade; Grosso, 2002).

Os agentes encapsulantes utilizados na microencapsulação de microrganismos são os alginatos, aceto fitalato de celulose, quitosana e as gomas (Krasaekoopt et al., 2004; Lee et al., 2004)

Polímeros naturais têm despertado o interesse dos pesquisadores devido às vantagens que apresentam, tais como a facilidade de obtenção, baixa toxicidade, maior biodisponibilidade e melhor biocompatibilidade (Chen et al., 1987).

Entre os vários polímeros naturais, proteínas e polissacarídeos, que formam hidrogéis, têm recebido maior atenção, em parte, por serem biodegradáveis e atóxicos (Chen et al., 1995).

1.5.1. Coacervação

O termo coacervação vem do latim “co” e “acervus”, o qual significa união e agregação de partículas (Vandegaer, 1974).

O método de coacervação foi relatado pela primeira vez no início do século XX por Tiebacckx. No entanto, foi Bungenberg de Jong e Kruyt os primeiros a investigarem o sistema de goma arábica-gelatina (Tiebacckx, 1911).

De acordo com Gouin (2004), a coacervação consiste na separação de fase de um ou mais hidrocolóides, e subsequente deposição destes hidrocolóides sobre o ingrediente ativo suspenso ou emulsionado no meio, dando origem à fase coacervada.

Existem essencialmente dois métodos de coacervação, a simples e a complexa. A primeira consiste na evaporação do solvente que envolve as moléculas do colóide, através da adição de outro solvente não eletrólito (ex: sais ou álcoois), no qual o hidrocolóide é insolúvel. A coacervação complexa consiste na combinação de

duas soluções hidrocolóides de cargas opostas, causando interação e precipitação de polímeros complexos (Kester et al., 1986).

A coacervação é um processo reversível e, de modo geral, a formação de microcápsulas é um processo de equilíbrio. Caso este equilíbrio seja deslocado, a separação de fase não ocorre (Finch, 1990).

Para a obtenção de sistemas coacervados, os biopolímeros devem possuir propriedades coloidais, densidades de cargas adequadas, cadeias lineares, entre outros. Dentre os quais podemos citar as gelatinas, gomas, alginatos, caseínas, pectinas e outros (Vandegaer, 1974).

As pectinas são polissacarídeos complexos encontrados na parede celular primária e nas camadas intercelulares de plantas terrestres. São mais abundantes em frutos e em tecidos jovens, tais como cascas de frutas cítricas (Brandão; Andrade, 1999).

Estruturalmente, as moléculas de pectina são constituídas de uma cadeia linear de unidades repetidas do ácido D-galacturônico em ligação de α (1 $\rightarrow$ 4), sendo que parte destas unidades apresenta-se esterificada, como éster metílico. As cadeias de resíduos galacturonato são, porém, interrompidas por unidades de L-ramnose em ligação α (1 $\rightarrow$ 2), formando às cadeias laterais. As pectinas são subdivididas em duas classes, uma com alto grau de metoxilação (>50%), e a outra com baixo grau de metoxilação (<50%), que também pode possuir grupos amida. As primeiras possuem considerável poder gelificante e são amplamente usadas na geleificação de sucos de frutas para a obtenção de geléias (Brandão; Andrade, 1999). Estes polissacarídeos resistem à hidrólise no trato gastrointestinal superior (TGIS), e são hidrolisados no cólon pelas pectinases produzidas pela microbiota natural. Dessa forma, têm sido avaliados como material de revestimento de formas

farmacêuticas sólidas ou como sistemas matriciais para conferir à forma farmacêutica uma liberação no cólon (Mungeri et al., 1997).

As caseínas são glicofosfoproteínas de origem animal, obtidas da fração protéica precipitada após acidificação do leite desnatado a um pH de 4,6 a 20°C. São constituídas de micelas com 40 a 300 nm de diâmetro. As micelas são formadas por submicelas, grosseiramente esféricas, contendo agregados de várias moléculas de caseína (Fiat; Jollés, 1989).

Em estudos prévios, realizados no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento Farmacotécnico da FCFRP-USP, foi demonstrada a viabilidade da preparação de uma dispersão de pectina e caseína, cuja análise por espectroscopia na região do infravermelho, seguido de tratamento de deconvolução das bandas localizadas na região das impressões digitais, sugere a formação de um complexo de pectina e caseína por ligação covalente (Lopes, 2004).

As características apresentadas pelo complexo, associadas ao fato de todos os procedimentos serem realizados em meio aquoso e, em condições brandas (pH 8,0 a 5,0 e temperatura ambiente 25°C), sugerem ser ele adequado para microencapsulação de células vivas (probióticos). Paralelamente em estando as células previamente encapsuladas, o estresse devido à secagem deve ser menor, sugerindo que o processo como um todo seja viável para a obtenção de culturas de probióticos na forma sólida.

1.6. *Spray drying*

O primeiro relato da utilização da técnica de *spray drying* data de 1865, no qual envolvia a secagem de ovos. Em 1920, este processo começou a ser utilizado em grande escala, nas indústrias de leite e detergentes (Masters, 1985).

O processo de *spray drying* pode ser utilizado como um método de secagem das micropartículas, anteriormente preparadas por outra técnica, ou como um processo de obtenção de microcápsulas (Broadhead et al., 1992).

A secagem pelo método de *spray drying* consiste na atomização de um líquido, que pode apresentar características físicas diversas (dispersão, solução, suspensão) e que contém o material a ser encapsulado e o polímero encapsulador, no interior de uma câmara de secagem, na qual também é inserida uma corrente de ar aquecido. Esta operação se divide em etapas distintas: nebulização ou atomização do líquido; mistura do *spray* formado com o ar aquecido; secagem do material e por último a separação do produto seco (Masters, 1985).

Esta técnica de microencapsulação é aplicável para materiais ativos termo-sensíveis devido à rápida evaporação do solvente que compõe as gotículas. Outras vantagens que esta técnica oferece é o fato de ser de baixo custo, e a facilidade de ampliação para escala industrial, sendo possível à obtenção de grande quantidade de produto seco e por permitir a utilização de uma grande variedade de materiais de parede (Ré, 1998).

Lievense e Van't Riet (1993), verificaram que os depósitos na parede do secador também podem influenciar a taxa de sobrevivência dos microrganismos. Estes depósitos aumentam o tempo de residência e assim a inativação térmica das células bacterianas.

Chandramouli et al., (2003) otimizaram a metodologia para microencapsulação de *Lactobacillus* ssp com alginato de cálcio. Os resultados indicaram que a viabilidade do lactobacilo encapsulado, submetido à simulação das condições gástricas, aumentou com o aumento da concentração do polímero. Esta

maior proteção foi atribuída ao aumento de sítios de ligação para o cálcio, como favorecendo maior reticulação.

1.7. Leito de Jorro

O termo leito de jorro foi concebido pelo National Research Council of Canada em 1954, por Gishler e Mathur. Inicialmente esta técnica foi desenvolvida como um método para secagem de trigo, entretanto, como a utilização de ar quente foi superior à secagem convencional de trigo, sem causar danos ao grão, isto fez com que estes pesquisadores percebessem que a técnica pudesse ter uma aplicação mais ampla, assim eles começaram a estudar as características de um leito de jorro (Mathur; Epstein, 1974).

O leito de jorro tem sido considerado como uma versão modificada do leito fluidizado, especialmente para partículas maiores que 1mm, para as quais geralmente não se obtinha um regime de operação adequado num leito fluidizado (Mathur; Epstein, 1974). Apresentam como características um regime de jorro que é estabelecido em um leito de partículas através da injeção de um fluido por um orifício na sua parte inferior cujo diâmetro é reduzido em relação ao diâmetro do leito, ocorrendo a formação de um canal preferencial. Como consequência ocorre a formação de regiões distintas (Mathur; Epstein, 1974).

1- Região Central (canal preferencial) – ocorre o transporte pneumático das partículas devido à grande velocidade do fluido. Nesta região as partículas possuem um movimento ascendente, ou seja, concorrente com o fluido. Esta região apresenta alta porosidade.

2- Região de Jorro (fonte) – região superior ao ânulo. As partículas advindas da região central perdem totalmente sua energia cinética, caindo na região anular.

3- Região Anular (deslizante/ ânulo) – Localizada entre o canal central e a parede do leito, no qual as partículas provenientes da região de jorro caem na região anular, deslizando-se em direção à base do leito. O movimento das partículas é contracorrente ao movimento do fluido. Esta região é caracterizada por possuir baixa porosidade.

O conjunto destas três regiões forma um regime com movimento cíclico e razoavelmente ordenado das partículas no interior da coluna, estabelecendo um sistema fluidodinâmico, que caracteriza a técnica de leito de jorro.

A configuração originalmente desenvolvida para o leito de jorro consiste em uma coluna cilíndrica acoplada em uma base cônica, com um orifício central por onde é injetado o fluido.

Esta técnica é indicada para secagem de materiais termo-sensíveis, como produtos biológicos (Pham, 1983), leveduras, polpa de frutas e antibióticos (Markowski, 1993; Alsina et al., 1996).

O processo de secagem em leito de jorro mostrou ser promissor para a secagem de microcápsulas de pectina e caseína obtidas por coacervação complexa (Bacarat et al., 2004), sugerindo a possibilidade de aplicação na secagem de microrganismos previamente microencapsulados com este polímero.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral da presente investigação foi a preparação e avaliação de microcápsulas contendo microrganismos probióticos.

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho compreenderam:

- 1) Preparação das microcápsulas a base do complexo pectina e caseína carregadas com os microrganismos probióticos *L. acidophilus* e *B. lactis*;
- 2) Secagem das microcápsulas por *spray drying* e leito de jorro;
- 3) Avaliação do teor de umidade das microcápsulas;
- 4) Avaliação da resistência de *B. lactis* e *L. acidophilus* aos processos de secagem;
- 5) Avaliação “in vitro” da sobrevivência de *B. lactis* e *L. acidophilus* em pH ácido, ou seja, em condições similares as do estômago;
- 6) Avaliar a estabilidade dos microrganismos encapsulados durante a estocagem por 120 dias (*Shelf life* das microcápsulas);
- 7) Caracterização morfológica das microcápsulas contendo probióticos por Microscopia Ótica e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3. Delineamento Experimental

3.1. Materiais

Nos processos de obtenção das microcápsulas foram empregados: Pectina cítrica GENU® tipo USP (ref. 13596) que possui grau de esterificação de 68% e peso molecular médio maior que 10^5 (fornecida gentilmente pela CPKelco, Brasil S/A), caseína bovina (Katuffmann & Co, Alemanha) e hidróxido de sódio P.A. (Synth, Brasil).

Culturas: *Bifidobacterium lactis* (BI-01) e *Lactobacillus acidophilus* (Lac-04) foram gentilmente doados pela Danisco, Brasil, puras e liofilizadas e foram estocadas a uma temperatura de -18°C .

Ágar MRS (Acumedia, USA), Citrato de sódio (T. J. Baker, ACS, U.S.A.), Ácido clorídrico P.A. (Synth, Brasil).

Jarras de Anaerobiose e Envelope de Anaerobiose (Probac, Brasil).

3.2. Métodos

3.2.1. Preparação das microcápsulas

As microcápsulas foram preparadas de acordo com o método descrito por Baracat (2004), com algumas modificações. Os polímeros pectina e caseína (concentração de sólidos totais 8%) foram dispersos em água destilada sob agitação mecânica e o pH foi ajustado para 8,0 ($\pm 0,1$) usando solução de hidróxido de sódio 4,0M. Posteriormente esta dispersão foi esterilizada em autoclave vertical Phoenix (Modelo AV 75). Após completa dispersão dos polímeros, em capela de fluxo laminar Veco modelo VLFS – 12 série FL 1322, os microrganismos *B. lactis* e *L. acidophilus*

foram adicionados. Assim que os microrganismos foram adicionados, verificou-se a redução do pH da dispersão para 4,8.

3.2.2. Secagem das microcápsulas por *spray drying*

As microcápsulas, contendo *B. lactis* e *L. acidophilus* obtidas pela dispersão do complexo pectina e caseína foram secas por atomização em *spray dryer* modelo LM-MSD 1.0 (Labmaq do Brasil Ltda), Figura 1, no qual as condições operacionais utilizadas são mostradas na Tabela 1.

Figura 1. Diagrama esquemático do *spray dryer*. (1) entrada de ar; (2) aquecedor; (3) bico de atomização e entrada de ar de atomização; (4) ciclone; (5) saída de ar; (6) sensor de temperatura, entrada de ar; (7) sensor de temperatura, saída de ar; (8) frasco coletor

Tabela 1. Condições operacionais utilizadas na secagem das microcápsulas de pectina e caseína, contendo *L. acidophilus* e *B. lactis*, em *spray dryer*

Parâmetros	Condições operacionais
Temperatura de entrada (° C)	70
Temperatura de saída (° C)	46
Pressão do ar de secagem (Kgf/cm ²)	4,0
Vazão de alimentação da dispersão (ml/min)	2,5
Diâmetro de saída do ar no sistema atomizador (mm)	1,2

3.2.3. Secagem das microcápsulas em leito de jorro com partículas inertes

As microcápsulas obtidas por coacervação complexa foram secas em um secador tipo leito de jorro convencional (CSB), o qual é composto por uma coluna cilíndrica de 140 mm de diâmetro e 830 mm de altura, acoplada a uma base cônica com ângulo interno de 60° e altura de 95 mm. O diâmetro do orifício de entrada do ar foi de 22 mm e a dispersão de microcápsulas contendo *B. lactis* e *L. acidophilus* foi aplicada ao sistema, a uma vazão de 2,5 ml/min, por gotejamento controlado pela bomba peristáltica LS (Masterflex, USA). Foi utilizado como sistema de fornecimento de ar um compressor da marca Wayne (Brasil), com capacidade de 120 scfm (pés cúbicos por minuto). A temperatura do ar foi medida e controlada por um controlador digital PID (proporcional, integral e derivada) modelo HW 2000 (Coel Ltda., Brasil), cujo valor de entrada e saída, respectivo, foi de 53°C e 46°C, Figura 2.

Como material inerte foram utilizadas esferas de vidro de 2,6mm de diâmetro, sendo que os dados provenientes de sua caracterização estão descritos na Tabela 2.

Figura 2. Diagrama esquemático do leito de jorro convencional: (1) soprador; (2) aquecedor; (3) medidor de vazão; (4) válvula; (5) secador leito de jorro; (6) termopar; (7) dispersão de microcápsulas; (8) bomba peristáltica; (9) ciclone; (10) coletores do pó

Tabela 2: Características do material inerte

Material	Vidro
Diâmetro da partícula	2,6mm
Esfericidade	1,0
Densidade da partícula	2,5 g/cm ³
Densidade aparente	1,59 g/cm ³
Porosidade na fluidização incipiente ¹	0,387
Velocidade mínima de fluidização ¹	117,1 cm/s
Ângulo de fricção interna ²	17,5°
Ângulo de fricção de parede ²	33,1°

¹ Determinado em uma coluna de fluidização 83 mm / ² Determinado em célula de Dawes

A altura máxima de jorro estável e a velocidade mínima de jorro foram estabelecidas através do emprego dos métodos clássicos (Mathur; Epstein, 1974).

As condições operacionais empregadas durante a secagem encontram-se reunidas na Tabela 3.

Tabela 3. Condições operacionais utilizadas na secagem das microcápsulas de pectina e caseína, contendo *L. acidophilus* e *B. lactis*, em leito de jorro

Parâmetros	Condições operacionais
Temperatura de entrada (°C)	53
Temperatura de saída (°C)	46
Vazão de alimentação da dispersão (ml/min)	2,5
H/H _{máx} (%) ^{A}	60
V/V _{mj} ^{B}	1,3

^{A} Relação entre a altura utilizada (17cm) e a altura máxima de jorro estável determinada (28cm);

^{B} Relação entre a velocidade do ar de jorro empregada e a velocidade mínima de ar de jorro.

3.2.4. Avaliação do teor de umidade das microcápsulas

Para determinação do teor de umidade das microcápsulas foi utilizado o analisador de umidade com lâmpada halógena MB 45 (Ohaus, USA). Este equipamento consiste de duas unidades, uma balança de precisão e uma unidade de secagem. O princípio da análise é a termogravimetria.

Uma amostra de massa superior a 0,5g foi colocada na balança e pesada, tendo assim uma massa inicial. Com o início do teste, a lâmpada halógena é ativada e fornece calor à unidade de secagem até que se atinja a temperatura de 100,5°C e a balança de precisão executa pesagens sucessivas da amostra até que se atinja uma massa constante entre duas pesagens consecutivas.

O teor de umidade é fornecido automaticamente, pelo instrumento, em porcentagem.

3.2.5. Avaliação da resistência de *B. lactis* e *L. acidophilus* aos processos de secagem em *spray dryer* e leite de Jorro

Visando determinar o efeito das condições de secagem na viabilidade dos microrganismos, foram feitas contagens nas dispersões e nos pós obtidos após os processos de secagem, sendo que estes foram reconstituídos em solução de citrato de sódio 2%.

B. lactis e *L. acidophilus* foram enumerados no meio MRS agar (Acumedia USA). As inoculações foram feitas pela técnica de semeadura em profundidade (Pour-plate). As diluições seriadas foram preparadas usando uma solução de citrato de sódio a 2%. As placas foram incubadas em jarras contendo anaerobac (Probac, São Paulo, Brasil), as quais geram sistemas de anaerobiose, a 37°C por 72h. O plaqueamento foi realizado em duplicata.

3.2.6. Avaliação “in vitro” da sobrevivência de *L. acidophilus* e *B. lactis* em pH 1 e 3

O efeito de soluções com pH similar aos encontrados no estômago humano sob *B. lactis* e *L. acidophilus* livres e microencapsulados foi verificado da seguinte maneira: Estes microrganismos foram colocados em soluções de ácido clorídrico com pH ajustado para 1 e 3. A coleta das alíquotas foi realizada no tempo zero e três horas e procedeu-se à análise microbiológica das mesmas conforme item 3.2.5. Como controle foi utilizado solução de citrato de sódio 2%. Deve-se salientar que todas as soluções citadas acima foram esterilizadas em autoclave a 121°C por 15 minutos.

3.2.7. Estabilidade dos microrganismos encapsulados durante a estocagem (*Shelf life* das microcápsulas)

As microcápsulas de *L. acidophilus* e *B. lactis* foram estocadas, em frascos com tampa rosqueada, em temperaturas de 7 e 37°C, geladeira e estufa, respectivamente. A sobrevivência destes probióticos foi monitorada através de análise microbiológica, como descrito no item 3.2.5, após T₁, T₃₀, T₆₀, T₉₀ e T₁₂₀ dias de estocagem do produto.

3.2.8. Caracterização morfológica das microcápsulas contendo probióticos por Microscopia Ótica e por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A caracterização das microcápsulas foi realizada tanto por microscopia ótica no equipamento Carl Zeiss, quanto por microscopia eletrônica de varredura, sendo que neste último os pós foram fixados em uma das faces da fita adesiva metálica

(dupla face), a outra face da fita era colada em stubs, em seguida foi feito o recobrimento com uma fina camada de ouro, sob atmosfera de argônio, através do evaporador Balzer (modelo SCD 050, Baltec Lichtenstein, Áustria) por 75s, aplicando uma corrente de 40 mA. A avaliação da morfologia das microcápsulas foi feita através de microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-T300, Tóquio, Japão), com voltagem de 5 kV.

3.2.9. Análise estatística

Para avaliar a resistência de *B. lactis* e *L. acidophilus* frente aos processos de secagem utilizou-se o Delineamento Experimental Inteiramente Casualizado considerando os efeitos dos dois tratamentos antes e após a secagem e 4 repetições por tratamento.

Já para a avaliação da estocagem das microcápsulas (*shelf life*) sobre o logaritmo na base 10 do número de probióticos, considerou-se o Delineamento Experimental Inteiramente Casualizado, com desdobramento dos graus de liberdade de tratamentos em esquema fatorial 2x5. Nestas análises, o modelo estatístico contemplou os efeitos principais da temperatura de estocagem (7°C versus 37°C) e dos períodos de monitoramento (0, 30, 60, 90 e 120 dias), além da interação entre os efeitos principais. Em caso de interações significativas ($P < 0.05$), procedeu-se o desdobramento tempo de estocagem dentro de cada um dos diferentes períodos de monitoramento. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o Método de Quadrados Mínimos, por meio do procedimento PROC GLM do programa Statistical Analysis System, versão 8.2 (SAS, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e discussão

4.1. Avaliação da resistência de *B. lactis* e *L. acidophilus* aos processos de secagem

É inegável o crescimento significativo de pesquisas em busca de métodos de preservação de microrganismos.

Atualmente o método mais utilizado, para este fim, consiste na liofilização. As culturas de bactérias ácido lácticas comerciais são freqüentemente liofilizadas para manter a viabilidade (capacidade de reproduzir) e atividade (habilidade para produzir ácido láctico) Cardona et al., (2002). No entanto, a liofilização, apesar de muito eficaz, trata-se de um processo de custo elevado e sua escala de produção é relativamente baixa.

Outra técnica bastante utilizada é a atomização (*spray drying*), sendo que este processo tem mostrado resultados positivos na microencapsulação de probióticos, mesmo submetendo-os a temperaturas elevadas durante a secagem (Favaro-Trindade; Grosso, 2002).

No entanto, a maior limitação no emprego desta técnica é a perda da viabilidade das culturas probióticas, a qual pode ocorrer durante o processamento e estocagem do produto seco (Desmond; Ross et al., 2002; Desmond et al., 2002).

No presente trabalho, após a secagem das microcápsulas pelo processo de atomização (*spray drying*) e por leite de Jorro, foi determinado o número de microrganismos viáveis antes (dispersão de microcápsulas) e após secagem (pó reconstituído), para se verificar o efeito dos processos de secagem sobre a população de *B. lactis* e *L. acidophilus*.

As contagens de *L. acidophilus* e *B. lactis* na dispersão e no pó coletado do *spray dryer* foram muito semelhantes, sendo que o primeiro sofreu redução de 0,4 e o segundo de 0,6 ciclos logarítmicos (Figura 3). Estes valores revelaram que as condições de atomização empregadas não foram muito agressivas para estes microrganismos e garantiram a integridade celular da maioria da população.

Uma redução no número de células viáveis dos microrganismos é de certa forma esperada, em virtude da aplicação de elevadas pressões e temperaturas, que provocam perda de água intracelular, indispensável à sobrevivência do microrganismo, como também podem ser causa de inativação de proteínas essenciais para a manutenção do equilíbrio celular.

Ananta et al., (2005), durante a secagem de *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) avaliaram temperaturas de saída entre 70 a 100°C, sendo que estes pesquisadores concluíram que a sobrevivência foi inversamente proporcional à temperatura de saída.

O'Riordan et al., (2001) empregaram temperaturas de secagem no *spray dryer* de 100°C para entrada e 45°C para saída e obtiveram uma redução de menos de 1 ciclo logarítmico na população de *Bifidobacterium* PL1.

De fato, a pequena redução determinada na população dos *L. acidophilus* e *B. lactis*, da presente investigação, permitiu concluir que as condições empregadas neste processo foram mais adequadas quando comparadas àquelas utilizadas por Favaro–Trindade; Grosso (2002), no qual a temperatura de entrada e saída de 130/75°C, respectivamente, provocou uma redução de 2 ciclos logarítmicos na população de *L. acidophilus* (La–05) e quando estes pesquisadores aumentaram a temperatura de entrada e saída para 190/120°C, respectivamente, verificaram uma redução de 4 ciclos logarítmicos.

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram inferir que a secagem em leite de jorro, assim como por *spray drying*, foi adequado para secagem das dispersões de microcápsulas, uma vez que a redução na população de *B. lactis* e *L. acidophilus* foi de 0,3 ciclos logarítmicos para ambos (Figura 4). Este valor revelou que as condições empregadas no processo de secagem em leite de jorro não foram muito agressivas para estes microrganismos, pois assim como o *spray drying* garantiu a viabilidade celular da maioria da população, provavelmente por já estarem encapsulados, quando submetidos ao processo de secagem.

Este resultado diferiu do reportado por Markowski (1993), segundo este autor, o leite de jorro diluído (JSB) não é adequado para secagem de células microbianas muito termolábeis, pois as membranas celulares da população de *Saccharomyces cerevisiae* foram destruídas devido ao efeito térmico e ao atrito entre as partículas inertes.

Comparando-se as Figuras 3 e 4, nota-se que ambos os processos empregados na secagem das dispersões contendo as células de *L. acidophilus* e *B. lactis* encapsulados foram eficientes, e proporcionaram resultados muito semelhantes, uma vez que as reduções de *L. acidophilus* e *B. lactis* para o *spray drying* foram respectivamente de 0,4/0,6 e para o leite de jorro foram de 0,3 ciclos logarítmicos para ambos microrganismos.

Figura 3. Avaliação da resistência de *L. acidophilus* e *B. lactis* ao processo de secagem em *spray dryer*. Valores médios obtidos de 4 tratamentos

Figura 4. Avaliação da resistência de *L. acidophilus* e *B. lactis* ao processo de secagem em leito de jorro. Valores médios obtidos de 4 tratamentos

4.2. Avaliação do teor de umidade das microcápsulas

O teor de umidade final é um fator importante na conservação e viabilidade de microrganismos desidratados (Champagne et al., 1996). É válido ressaltar que esta análise também permitiu a reconstituição dos pós obtidos nos processos de secagem, facilitando assim a comparação da população microbiana presente na dispersão e no produto obtido na secagem (pó).

Deste modo, os conteúdos de umidade determinados na dispersão e no pó, obtido do *spray dryer*, contendo *L. acidophilus* e *B. lactis* foram respectivamente de 90,97% / 9,58% e 92,8% / 10,98% . Este resultado diferiu dos determinados por Favaro-Trindade; Grosso (2002), os quais variaram de 5,3 a 3,2% no pó, quando estes encapsularam *B. lactis* e *L. acidophilus* em *spray dryer* utilizando aceto fitalato de celulose e dos reportados por Ananta et al., (2005), quando utilizaram uma temperatura de saída de 80°C do *spray dryer*, para produzir preparações secas de leite desnatado e prebióticos contendo *L. rhamnosus* GG, obtiveram um teor de umidade de 4,5%. Algumas das explicações para estas diferenças podem ser dadas com base nos relatos de Scott, (1958), em que o conteúdo de umidade residual ótimo varia com a composição do material em que os microrganismos são secos, com a atmosfera de estocagem e com a espécie do microrganismo. Deve-se salientar também o fato de que quanto maior a temperatura empregada no processo de secagem, menor o teor de umidade residual, justificando assim os menores teores de umidade obtidos nos trabalhos citados, já que os autores utilizaram temperaturas de processo mais altas em relação às empregadas no presente estudo.

Gardner et al., (2000), diminuíram a temperatura de saída de 180 para 175 °C e como esperado o conteúdo de umidade aumentou de 3,2 para 3,5%.

Os conteúdos de umidade determinados na dispersão e no pó, obtido do leite de jorro, contendo *L. acidophilus* e *B. lactis* foram respectivamente de 91,90% / 9,58% e 91,80% / 9,68 %. Não foi encontrado nenhum relato na literatura a respeito do teor de umidade em pós obtidos por leite de jorro, utilizando-se condições similares às empregadas neste trabalho.

4.3. Avaliação da sobrevivência dos *L. acidophilus* e *B. lactis* livres e microencapsulados, secos em *spray dryer*, frente ao pH 1 e 3

Diferentes fatores, tais como, tamanho das cápsulas, concentração e tipo do polímero estão envolvidos na proteção dos microrganismos encapsulados frente ao pH ácido (Chandramouli et al., 2003).

No atual trabalho, as células livres dos *L. acidophilus* se mostraram pouco resistentes às condições ácidas estudadas, já que após o período de 3 horas de incubação foi verificada uma redução significativa na contagem das mesmas, de até 3 ciclos logarítmicos em pH 1 e de 1 ciclo logarítmico em pH 3, como pode ser evidenciado na Figura 5. No entanto, *L. acidophilus* microencapsulados se mostraram resistentes às condições similares as do estômago (pH 1 e 3), uma vez que não houve redução na população microbiana, permanecendo em torno de 10^8 UFC/ml, mesmo após 3 horas de incubação, nos três tratamentos testados (Figura 5).

Entretanto, *B. lactis* se mostrou mais sensível às condições ácidas estudadas quando comparado ao *L. acidophilus*. As células livres de *B. lactis* se mostraram pouco resistentes ao pH ácido, uma vez que após o período de 3 horas de incubação houve uma redução de mais de 3 ciclos logarítmicos em pH 1 e de 0,9 ciclo em pH 3, em comparação ao controle, como mostra a Figura 6. Por outro lado,

B. lactis microencapsulados apresentaram uma boa resistência quando incubados em soluções de pH 3, porque não houve diferença quando comparado ao controle, porém, foi verificada uma redução de 1 ciclo logarítmico quando este foi incubado em solução de pH 1.

A maior resistência de *L. acidophilus*, em pH 1, em comparação ao *B. lactis*, pode ser justificada em função de vários fatores, incluindo espécie e cepa melhor adaptada às condições de alta acidez (Desmond et al., 2002).

Favaro-Trindade; Grosso (2002) encapsularam *L. acidophilus* (La-05) e *B. lactis* (Bb-12) em aceto fitalato de celulose e obtiveram resultados opostos aos realizados neste trabalho. *B. lactis* mostraram-se mais resistentes às condições ácidas estudadas do que *L. acidophilus*.

Desmond et al., (2002), reportaram que a encapsulação de *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 em *spray dryer*, utilizando a goma acácia como material encapsulante, contribuiu na proteção das células, já que quando exposta ao pH 3 durante um período de 120 minutos, a população das células microencapsuladas sofreu uma redução de 4 ciclos, enquanto as células não encapsuladas sofreram redução de 6 ciclos logarítmicos, confirmando assim, o caráter protetor do agente encapsulante. Mas, o uso da goma acácia como agente protetor não pode ser considerado tão eficaz à proteção dos microrganismos probióticos em relação à utilização do complexo pectina e caseína, pois, a encapsulação de *L. acidophilus* e *B. lactis* com o uso deste material, resultou em uma tolerância maior às condições de pH, ou seja, proveu uma melhor proteção durante a exposição de 180 minutos, além disso, este complexo é insolúvel em pH ácido e solubiliza-se em pH neutro, ou seja, funciona como um agente entérico (Baracat, 2004), o que possibilita a liberação da cultura probiótica apenas no intestino, onde esta deve atuar.

Microcápsulas de acetato-ftalato de celulose obtidas por atomização foram efetivas na proteção dos microrganismos *L. acidophilus* (La-05) e *B. lactis* (Bb-12), em soluções ácidas, já que após 2 horas de exposição ao pH 2, estes sofreram redução de apenas 1 ciclo logarítmico, enquanto as células livres dos La-05 e Bb-12 não resistiram às condições de pH (Fávaro-Trindade; Grosso 2002). Relacionando este estudo de Fávaro-Trindade; Grosso com o obtido na presente investigação, as microcápsulas do complexo pectina e caseína, podem ser consideradas mais eficazes na proteção ao pH ácido, pois, mesmo com a incubação em um pH menor (pH 1) durante 3 horas, *L. acidophilus* microencapsulados se mantiveram viáveis durante todo o período de exposição e *B. lactis* sofreram uma redução de 0,9 ciclos logarítmicos em pH 1 por 180 minutos.

As microcápsulas do complexo utilizado neste estudo também foram mais eficazes em proteger as culturas probióticas do que alginato de cálcio, uma vez que este não promoveu proteção contra as condições similares às do estômago, haja visto que das quatro culturas probióticas selecionadas e microencapsuladas neste polímero por Hansen et al., (2002), somente *B. lactis* sobreviveram por cinco minutos em pH 1.

Sultana et al., (2000) encapsularam *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. com uma mistura de alginato 2% e amido de milho 2%. Entretanto, as bactérias encapsuladas não se mantiveram viáveis quando submetidos à alta acidez.

Figura 5. Efeito do pH na sobrevivência de *L. acidophilus* livres e microencapsulados, secos em *spray dryer*. Números em parênteses indicam o tempo (h) de exposição do microrganismo ao pH específico.

Figura 6. Efeito do pH na sobrevivência de *B. lactis* livres e microencapsulados, secos em *spray dryer*. Números em parênteses indicam o tempo (h) de exposição do microrganismo ao pH específico.

4.4. Avaliação da sobrevivência dos *L. acidophilus* e *B. lactis* livres e microencapsulados, secos em leite de jorro, frente ao pH 1 e 3

Neste estudo, quando *Lactobacillus acidophilus* foi submetido às soluções que simulam o pH do estômago, pode-se notar pela análise da Figura 7, que as populações destes microrganismos microencapsulados e secos em leite de jorro foram reduzidas rapidamente em ambas soluções, após três horas de incubação, chegando a uma redução de 2,7 ciclos em pH 3 e completa em pH 1. A baixa resistência do microrganismo encapsulado e seco em leite de jorro frente às condições ácidas permite inferir que embora as células não tenham morrido durante o processo de secagem, sofreram danos que as impossibilitaram de resistir às condições de pH. Também se sugere que o revestimento não foi uniforme, reduzindo a proteção, quando comparadas àquelas secas em *spray dryer*.

Esses resultados sugerem que a secagem das microcápsulas de *Lactobacillus acidophilus*, em leite de jorro, causou danos às células, pois, houve uma redução maior no número de colônias das células encapsuladas em comparação as contagens obtidas das células livres quando incubadas em soluções ácidas (Figura 7).

As células livres de *B. lactis*, após o período de 3 horas de incubação, sofreram uma redução de 2,6 ciclos logarítmicos em pH 1 e de 1 ciclo em pH 3, como mostra a Figura 8. No entanto, *B. lactis* microencapsulados e secos em leite de jorro, quando incubados em soluções de pH 3, verificou-se uma redução de 1 ciclo logarítmico e 2,6 ciclos logarítmicos quando este foi incubado em solução de pH 1.

Estes resultados mostram que a microencapsulação de *B. lactis* seguida de secagem em leite de jorro não propiciou proteção a estes microrganismos, visto que as reduções foram idênticas às obtidas para as células livres.

A redução similar nos ciclos das células livres e encapsuladas advogam a favor da hipótese de que o revestimento não foi eficiente.

Por sua vez, o processo de secagem por leite de jorro proveu um maior dano nas células de *L. acidophilus* do que em *B. lactis*, tornando-as sensíveis ao efeito do pH.

Como já foi mencionado, não foram encontrados trabalhos na literatura que tenham feito uso do leite de jorro com partículas inertes para secagem de microrganismos probióticos, para que seja feita uma análise comparativa com os resultados obtidos neste trabalho.

Figura 7. Efeito do pH na sobrevivência de *L. acidophilus* livres e microencapsulados, secos em leite de jorro. Números em parênteses indicam o tempo (h) de exposição do microrganismo ao pH específico.

Figura 8: Efeito do pH na sobrevivência de *B. lactis* livres e microencapsulados, secos em leite de jorro. Números em parênteses indicam o tempo (h) de exposição do microrganismo ao pH específico.

4.5. Estabilidade das microcápsulas, secas em *spray dryer*, durante a estocagem (*Shelf life* das microcápsulas contendo *L. acidophilus* e *B. lactis*)

O dano celular e a inativação podem ocorrer não só durante o processamento, mas também durante a estocagem de células desidratadas, portanto, além de sobreviver ao processo de microencapsulação e secagem, o microrganismo deve permanecer viável no pó durante algum tempo para que possa ser aplicado.

A análise acurada da Tabela 4 demonstra que o número de células viáveis de *L. acidophilus* manteve-se após 30 dias de estocagem, porém verificou-se redução destes microrganismos a partir dos 60 dias e os mesmos permaneceram em queda

até 120 dias. Este efeito manteve-se tanto no pó estocado à 7°C quanto à 37°C, ou seja, não foi dependente da temperatura de estocagem, sendo que ao longo desses quatro meses de armazenamento, ambos os tratamentos apresentaram uma evolução linear decrescente (Tabela 4).

Constatou-se diferença entre as condições de armazenamento somente na contagem feita após 120 dias de estocagem, onde de fato houve uma redução maior para o pó estocado a 37°C (Tabela 4), ou seja, somente nesse período verificou-se que a utilização da temperatura de refrigeração para o armazenamento, de *L. acidophilus* microencapsulado e seco em *spray dryer*, teve efeito benéfico. Assim, apenas neste período de estocagem o resultado obtido foi semelhante ao reportado por Desmond et al., (2002). Esses autores obtiveram maior viabilidade, de *L. paracasei* NFBC 338 microencapsulado por *spray drying* em goma arábica, quanto menor a temperatura utilizada, em todos os períodos analisados, durante 4 meses de estocagem do pó a 4, 15 e 30°C.

No presente trabalho, após 120 dias, a redução de *L. acidophilus* determinada foi de 0.71 e 1.93 ciclos logarítmicos a 7°C e 37°C, respectivamente. Esse resultado indica que a viabilidade da população de *L. acidophilus* foi boa e que o número de células viáveis permaneceu alto (maior que 10^6 UFC/ml) nas microcápsulas produzidas com o agente encapsulante pectina e caseína, mesmo quando estas foram armazenadas em temperatura alta e na presença de O₂.

Ao contrário de *L. acidophilus*, a estocagem de *B. lactis*, foi dependente da temperatura de estocagem, sendo que após 30 dias houve uma redução acentuada de *B. lactis* estocado a 37°C. Vários fatores justificam esta drástica redução nesta população. Porubcan and Sellars (1979), relataram que o oxigênio, a umidade e a luz são prejudiciais para culturas secas. Ishibashi and Shimamura (1993),

observaram que a permeação de oxigênio através da embalagem, durante a estocagem, afetou a viabilidade da bifidobacteria em leite ou iogurte. No entanto, na atual pesquisa, não se verificou grande redução de *B. lactis* estocada por 30 dias a 7°C, mas, verificou-se redução destes microrganismos a partir dos 60 dias e os mesmos permaneceram em queda até 120 dias.

Após 120 dias, a redução de *B. lactis* determinada foi de 4,34 e 6,06 ciclos logarítmicos a 7°C e 37°C, respectivamente. Esse resultado permite inferir que a viabilidade de *B. lactis* não foi adequada, uma vez que o número de células viáveis foi menor que 10⁶ UFC/ml, sendo que esta é a concentração mínima exigida pela legislação para que os probióticos exerçam suas atividades terapêuticas. Embora esse microrganismo tenha resistido ao processo de atomização, este pode ter causado danos, que levaram a morte durante o armazenamento.

Tabela 4. Estabilidade das microcápsulas contendo microrganismos, secas em *spray dryer*, durante a estocagem a 7 e 37°C

Tempo (dias)/ Temperatura	<i>B. lactis</i>		<i>L. acidophilus</i>	
	37°C	7°C	37°C	7°C
0	8,60 ^{A a}	8,60 ^{A a}	8,17 ^{A a}	8,28 ^{A a}
30	2,34 ^{B b}	7,24 ^{A b}	7,80 ^{A a,b}	7,86 ^{A a,b}
60	2,50 ^{B b}	6,15 ^{A c}	7,53 ^{A b}	7,64 ^{A b,c}
90	2,53 ^{B b}	5,17 ^{A d}	7,46 ^{A b}	7,25 ^{A c}
120	2,54 ^{B b}	4,26 ^{A e}	6,24 ^{B c}	7,57 ^{A c}

*Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam que estatisticamente há diferença significativa entre os valores. Já, letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, indicam que estatisticamente há diferença significativa entre os valores.

* Valores médios obtidos de 3 repetições.

4.5.1. Estabilidade das microcápsulas, secas em leite de jorro, durante a estocagem (*Shelf life* das microcápsulas contendo *L. acidophilus* e *B. lactis*)

A inativação de microrganismos durante a estocagem está relacionada com uma série de fatores, como a formação de radicais na presença de oxigênio, oxidação de ácidos graxos e danos no DNA (Castro et al., 1997).

Lievense, et al., (1994) baseado nas investigações encontradas na literatura, relatou que não há dúvida que a estabilidade de bactérias durante a estocagem aumenta com a diminuição da temperatura e que a estocagem de culturas bacterianas acima de 10°C, por vários meses e sem uma perda significativa da atividade, parece ser impossível.

No presente estudo, observa-se pela análise da Tabela 5, que os pós obtidos no leite de jorro, no primeiro dia de estocagem apresentaram populações de *L. acidophilus* de 9.02 e 9.16 log UFC/ml para as células conservadas em estufa e sob temperatura de refrigeração, respectivamente. As populações estocadas em uma menor temperatura (7°C) foram reduzindo gradativamente, chegando a 8.18 log UFC/ml após 90 dias e 5.94 log UFC/ml após 120 dias. Já a resposta ao armazenamento da população estocada na temperatura de 37°C, diferiu muito da estocada a 7°C, pois, no primeiro mês de estocagem houve uma grande redução na contagem das células viáveis: 2.6 ciclos logarítmicos, sendo que a contagem já não foi mais possível a partir do terceiro mês de armazenamento.

Pôde-se concluir que o pó armazenado em estufa apresentou uma pior estabilidade ao longo dos quatro meses, pois, na menor temperatura (7°C) a redução total em termos de ciclos logarítmicos foi de 3,22 na população dos

Lactobacillus acidophilus, enquanto na maior temperatura (37°C) foi em torno de 4,72 ciclos logarítmicos.

A análise da Tabela 5 demonstra que os pós obtidos no leite de jorro, no primeiro dia de estocagem, apresentaram populações de *B. lactis* de 8,47 log UFC/ml para as células conservadas tanto a 37°C quanto a 7°C.

De forma similar ao observado nos *L. acidophilus*, as populações de *B. lactis* estocadas a 7°C apresentaram uma redução gradativa, sendo que após 30, 60, 90 dias de estocagem foram respectivamente de 7,06 / 6,32 e 5,65, entretanto, *B. lactis* estocada a 37°C sofreram uma grande redução após 30 dias e permaneceram em queda até 90 dias de estocagem (Tabela 5).

Após 120 dias de estocagem, *L. acidophilus* e *B. lactis* estocados 37 e 7°C não apresentaram contagens, ou seja, já estavam inviáveis (Tabela 5).

Assim como os resultados relatados para os *L. acidophilus*, a estocagem de *B. lactis* na temperatura de 7°C foi mais viável do que a 37°C, pois a redução total em termos de ciclos logarítmicos após 4 meses, foi de 2,82 e 3,39, respectivamente.

Cardona et al., (2002) relataram que *Lactococcus lactis* ssp *lactis* (LL41-1) secos em bomba de calor com conservantes mostraram alta viabilidade durante estocagem a -20° e 4°C, no entanto, a viabilidade desta bactéria ácido láctica estocada a 25°C sofreu um rápido decréscimo após duas semanas.

Em concordância com o trabalho de Cardona et al., (2002), a estocagem em temperaturas menores são mais favoráveis á extensão da vida útil desses microrganismos probióticos.

Tabela 5. Estabilidade das microcápsulas contendo microrganismos, secas em leite de jorro, durante a estocagem a 7 e 37°C

Tempo (dias)/ Temperatura	<i>B. lactis</i>		<i>L. acidophilus</i>	
	37°C	7°C	37°C	7°C
0	8,47 ^{A A}	8,47 ^{A a}	9,02 ^{A a}	9,16 ^{A a}
30	5,78 ^{B B}	7,06 ^{A b}	6,76 ^{A b}	8,92 ^{B a,b}
60	5,48 ^{B C}	6,32 ^{A c}	4,30 ^{A c}	8,54 ^{B b,c}
90	5,08 ^{A C}	5,65 ^{A d}	0,00 ^{B d}	8,18 ^{B c}
120	0,00 ^{A D}	0,00 ^{A d}	0,00 ^{B d}	5,94 ^{B d}

*Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam que estatisticamente há diferença significativa entre os valores. Já, letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, indicam que estatisticamente há diferença significativa entre os valores.

* Valores médios obtidos de 3 repetições.

4.6. Caracterização morfológica das microcápsulas contendo probióticos por Microscopia Ótica

Embora a microscopia ótica não seja o método ideal para avaliação da morfologia das microcápsulas, em função da baixa resolução, esta técnica serve como um instrumento de avaliação preliminar, por ser rápida, simples e de baixo custo (Bertolini, 1999). Conforme se observa nas Figuras 9, 10 e 11 esta técnica permitiu a comprovação de que houve formação das microcápsulas com o agente encapsulante empregado.

Figura 9. Fotomicrografias óticas das microcápsulas de pectina e caseína “in natura” em pH 8,0.

Figura 10. Fotomicrografias óticas das microcápsulas de pectina e caseína após secagem por *spray drying*. (A) *L. acidophilus*; (B) *B. lactis*. Aumento de 100x.

Figura 11: Fotomicrografias óticas das microcápsulas de pectina e caseína após secagem em leite de jorro. (A) *L. acidophilus*; (B) *B. lactis*. Aumento de 45x.

4.6.1. Caracterização morfológica das microcápsulas contendo probióticos por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Estas avaliações morfológicas mostraram que as microcápsulas contendo *L. acidophilus* e *B. lactis*, secas em *spray dryer*, possuíam formato arredondado, com concavidades, sem poros ou rachaduras, e paredes contínuas, porém rugosas (Figura 12).

As fotomicrografias das microcápsulas contendo *L. acidophilus* e *B. lactis*, secas em leite de jorro, apresentaram-se na forma de placas de elevada dimensão, formadas pela coalescência das partículas individuais. Estas apresentaram tamanhos bem maiores, menos rugosas e características bem distintas das obtidas por *spray-dryer* (Figura 13).

Figura 12. Fotomicrografias obtidas por M.E.V. das microcápsulas de pectina e caseína após secagem por *spray drying*. (A) *L. acidophilus* (7000x); (B) *B. lactis* (3000x).

Figura 13. Fotomicrografias obtidas por M.E.V. das microcápsulas de pectina e caseína após secagem em Leito de Jorro. (A) *B. lactis* (450x); (B) *L. acidophilus* (700x).

CONCLUSÃO

5. Conclusões

- ❖ O presente estudo mostrou que o processo de coacervação complexa e o agente encapsulante empregado são adequados para microencapsulação de *L. acidophilus* e *B. lactis*.
- ❖ As condições de operação do *spray dryer* e do leito de jorro são adequados para a secagem de *L. acidophilus* e *B. lactis*, pois o microrganismo resistiu às condições empregadas.
- ❖ O produto obtido na secagem em *spray dryer* e leito de jorro possui um teor de umidade que garante uma boa estabilidade a culturas desidratadas.
- ❖ Microcápsulas de pectina e caseína, quando secas por *spray dryer*, foram eficientes para prover proteção aos *L. acidophilus* e *B. lactis* em pHs similares ao do estômago humano.
- ❖ Microcápsulas de pectina e caseína, quando secas em leito de jorro, não foram eficientes para prover proteção aos *L. acidophilus* e *B. lactis* em pHs similares ao do estômago humano.
- ❖ As microcápsulas de pectina e caseína, secas em *spray dryer*, contendo *L. acidophilus* armazenadas a 7 e 37°C conservaram a viabilidade desta cultura, o que viabiliza a aplicação comercial deste microrganismo. Entretanto, *B. lactis*

microencapsulados perdem sua viabilidade durante o armazenamento em ambas as temperaturas.

❖ As microcápsulas de pectina e caseína, secas em leite de jorro, contendo *L. acidophilus* possui um tempo de vida útil (*shelf life*) em torno de 90 dias, somente para a estocagem a 7°C. No entanto, *B. lactis* microencapsulados perdem sua viabilidade durante o armazenamento em ambas as temperaturas.

❖ A Microscopia Eletrônica de Varredura das microcápsulas de pectina e caseína secas por *spray dryer* apresentaram características distintas das obtidas em leite de jorro;

❖ Este trabalho confirma que o método utilizado na secagem das microcápsulas é tão importante quanto o agente encapsulante, para prover proteção a microrganismos probióticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências Bibliográficas

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC N° 2 de 7 de Janeiro de 2002.

Alsina, O. L. S.; Morais, V. L. M.; Lima, L. M. R.; Soares, F. H. L. Studies on the performance of the spouted bed dryer for the dehydration of West Indian cherry pulp. In: Drying' 96. Mujumdar, A. S. ed. Hemisphere Publishing Corp., New York, p. 867-872, 1996.

Ananta E.; Volkert, D.; Knorr, D.; Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG, International Dairy Journal, v. 15, p. 399-409, 2005.

Bakan, J. A. Microencapsulação. In: Lachman, L.; Lieberman, H. A.; Kanig, J. L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. 1.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v. 2, cap. 13, p. 707-735.

Baracat, M. M.; Nakagawa, A. M.; Freitas, L. A. P.; Freitas, O. Microcapsule processing in a spotted bed. Canadian Journal Chemistry Engineering, v. 82, p.1-8, 2004.

Bertolini, A. C. Estabilidade de óleo essencial de laranja, linalol e citral microencapsulados em goma arábica por atomização. Campinas /SP, 1999.

Brandão, E. M.; Andrade, C. T. Influência de Fatores Estruturais no Processo de Gelificação de Pectinas de Alto Grau de Metoxilação. Polímeros: Ciência e Tecnologia, p. 38-44, 1999.

Broadhead, J.; Rouan, E.; Rhodes, C.T. The *Spray drying* of pharmaceuticals. Drug Dev. Ind. Pharm., v.18, p. 1169-1206, 1992.

Cardona T.D.; Driscoll, R.H.; Paterson J.L.; Srzednicki, G.S.; Kim W.S. Optimizing conditions for heat pump dehydration of Lactic Acid Bacteria, *Drying Technology*, v. 20, n°8, p.1611-1632, 2002.

Castro H.P.; Teixeira P.M.; Kirby R., Evidence of menbrane damage in *Lactobaciillus bulgaricus* following freeze drying. *Journal Applied Microbiology*, v. 82, p. 87-94, 1997.

Champagne CP, Mondou F, Raymond Y, Roy D. Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Food Research International* v. 29, p. 555–562, 1996.

Chandramouli V.; Kailasapathy K.; Peiris P., Jones M., An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions, *Journal of Microbiological Methods*, v.56, p.27-35, 2003.

Chen, J.; Jô, S.; Park, K. Polysaccharide hydrogeis for protein drug delivery. *Polimers*. v. 28, p. 69 – 76, 1995.

Chen, Y.; Willmott, N.; Anderson, J.; Florense, A. T. Comparasion of albumin and casein microspheres as a carrier for doxorubicin. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 39, n.12, p.978 – 985, 1987.

Cho, K. Y.; Choi, S. H.; Kim, C-H.;Nam, Y. S.; Park, T. G.; Park, J-K. Protein release microparticles based on the blend of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) and oligo-ethylene glycol grafted poly(L-lactide). *Journal of Controlled Release*, Amsterdam, v. 76, p. 275-284, 2001.

Clark, P. A.; Martin, J. H. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: III – Tolerance to simulated bile concentrations of human small intestines¹. *Cultured Dairy Products Journal*, p. 18-21, 1994.

Cui, J.H.; Goh, J.S.; Kim, P.H.; Choi, S.H.; Lee, B.J. Survival and stability of bifidobacteria loaded in alginate poly-L-lysine microparticles. *International Journal of pharmaceuticals*, v. 210, p.51-59, 2000.

Desmond, C., Ross R. P., O' Callaghan E, Fitzgerald G, Stanton C.. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *Journal of Applied Microbiology* v.93, p.1003-1011, 2002.

Desmond, C.; Stanton, C.; Gitzgerald, G. F.; Collins, K.; Ross, R.P. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray-drying. *International Dairy Journal*, v.11, p.801-808, 2002.

Donbrow, M. Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy. Boca Raton, CRC Press, 1992, cap. 1, p. 1-13: Introduction and overview.

Fávaro-Trindade, C. S.; Grosso, C. R. F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La – 05) and *B. lactis* (Bb – 12) and evaluation on their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal of Microencapsulation*, v. 19, n. 4, p. 485 -494, 2002.

Fávaro-Trindade, C.S.; Grosso, C.R.F. The effect of the immobilization of *L. acidophilus* and *B. lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. *Michwissenshaft*, v.55, n.9, p. 496-499, 2000.

Ferreira F.A.B.; Kussakawa, K.C.K. Probióticos. *Biotechnologia Ciência ; Desenvolvimento*, ano II, n.8, p.40-43, 1999.

Fiat, A. M.; Jollés, P. Casein of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: structural and physiological aspects. *Molecular and Cellular Biochemistry*, Paris, n. 1, v. 87, p. 5-30, 1989.

Finch, C. A., Microencapsulation. In: Elvers, B., Hawkins, S., Schulz, G. Olmann's *Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5 ed., p. 575-588, 1990.

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

Gardner, G. E.; Sullivan, E. O.; Kelly, J.; Audy, M. A. E.; Fitzgerald, F.; Collins, J. K.; Ross, R. P.; Stanton, C. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and *Spray drying*. *Applied Environmental Microbiology*., Washington, v. 66, n. 6, p. 2605-2612, 2000.

Gomes, A. M. P.; Malcata, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, v. 10, n.4/5, p.139 – 157, 1999.

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

Hansen, L.T.; Allan-Wojtas, P.M.; Jin, Y.L.; Paulson, A.T. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology* 19: 35-45, 2002.

Hollingsworth, P. Mainstreaming health foods. *Food Technology*, v.51, n 3, p.55-58, 1997.

Ishibashi N, Shimamura S. Bifidobacteria: research and development in Japan. *Food Technology* v. 47, p. 126-135, 1993.

Jackson, L. S.; Lee, K. Microencapsulation and Food Industry, *Lebensmittel – Wissenschaftat Technologie*, v. 24, p. 289 – 297, 1991.

Kailasapathy, K.; Rybka, S. *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. – their therapeutic potential and survival in yogurt. *The Australian Journal of Dairy Technology*, v.52, p.28 – 35, 1997.

Kester, J.J., Fennema, O. R. Edible films and coatings: a review. Food Technology, v. 10, n. 12, p.4759, 1986.

Kim, H. S.;Kamara, B. J.; Good, I.C.; Enders Jr.G.L. Method for the preparation of stable microencapsulated lactic acid bacteria. Journal of Industrial Microbiology, v.3, p.253-257, 1988.

Krasaekoopt, W.; Bhandari, B.; Deeth, H.; The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. International Dairy Journal, V. 14, p. 737-743, 2004.

Laroia, S.; Martin, J. H. Bifidobacteria as possible dietary adjuncts in cultured dairy products: a review. Cultured Dairy Products Journal, v. 25, n.4, p. 18-22, 1990.

Laroia, S.; Martin, J. H. Effect of pH on survival of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in frozen fermented dairy desserts. Cultured Dairy Products Journal, V.26, n.4, p. 13-21, 1991.

Lee, J. S.; Cha, D. S. Park, H. J. Survival of Freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in Chitosan-Coated Calcium alginate microparticles. Journal of Agricultural and Food Chemistry, V. 52, p. 7300-7305, 2004.

Lee, K.Y.; Heo-Tae, R. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. Applied Environmental Microbiology, v.66, n 2, p.306-869, 2000.

Lievensse, L. C.; Vant't Riet, K. Convective drying of bacteria. Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology, v.50, p. 46-60, 1993.

Lievensse, L.C.; Van't Riet K., Convective drying of bacteria II: Factors Influencing Survival, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, v.51, p. 71-89, 1994.

Lilly, D. M. e Stillwell, R. H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. Science, v. 147, p. 747-748, 1965.

Lopes, Arony Aparecido. Preparação e caracterização físico-química do complexo pectina-caseína e avaliação de algumas propriedades funcionais, 2004, p.148. Dissertação de mestrado-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Markowski, A. S. Quality interaction in a Jet Spouted Bed Dryer for bio - products, *Drying Technology*, v. 11, n.2, p. 369 – 387, 1993.

Masters, K. *Spray drying Handbook*. 4° ed., New York: John Wiley, 1985, 696p.

Mathur, K.B.; Epstein, N. Spouted beds. 1° Edição. London: Academic Press, 303p., 1974.

Mattila-Sandholm, T.; Myllarinen, P.; Crittenden, R.; Mogensen, G.; Fondén, R.; Saarela, M. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, v.12, p.173-182, 2002.

Modler, H. W.; McKellar, R. C.; Yaguchi, M. Bifidobacteria and bifidogenic factors¹. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, v. 23, n.1, p.29-41, 1990.

Mungeri, O; Collet, J. H.; Fell, J. T. Hydrogel beads based on amidated pectins for colon – specific drug delivery: The role of chitosan in modifying drug release. *Journal Control Release*, n.46, p. 273 – 278, 1997.

Nadian, A.; Lindblom, L. Studies on the development of a microencapsulated delivery system for norbormide, a species-specific acute rodenticide. *International Journal of Pharmaceutics*, Amsterdam, v. 242, p. 63 – 68, 2002.

O' Sullivan M. G., Thornton G., O' Sullivan G. C., e Collins J. K. Probiotic bacteria: myth or reality? *Trends in Food Science ; Technology*, v. 3, p. 309 – 314, 1992.

O'Riordan, K. O.; Andrews, D.; Buckle, K.; Conway, P. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to

prolonging viability during storage. *Journal Applied Microbiology*, v.91, p.1059-1066, 2001.

Parker, R. B.; Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition and Health*, v. 29, p. 4-8, 1974.

Pham, Q. T. Behavior of a conical spouted bed dryer for animal blood. *Canadian Journal Chemical Engineering*, v.61, p. 426-34, 1983.

Playne, M. J. Probiotic foods. *Food Australia*, v. 46, n.8, p.362-364, 1994.

Porubcan RS, Sellars RL. Lactic starter culture concentrates. In: Peppler HJ, Perlman D. (Eds.), *Microbial Technology*, 2th ed. New York: Academic Press. p 59-92, 1979.

Ré, M. I. Microencapsulation by *Spray drying*. *Drying Technology*, V. 16, n.6, p.1195 – 1236, 1998.

Salminen Seppo. Probiotics: Scientific Support for Use. *Food Technology*, v. 53, n. 11, p.66 – 77, 1999.

Sanders, M. E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, v.8, p.341-347, 1998.

Sanders, M. E. Probiotics. *Food Technology*, v. 53, n. 11, p. 67-77, 1999.

Sandor, M.; Ensore, D.; Weston P.; Mathiowitz, E. Effect of protein molecular weight on release from micron-sized PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release*, Amsterdam, v. 76, p. 297-311, 2001.

SAS. User's Guide: basic and statistic. 2001. Cary, NC: SAS, 1.686 p.

Scott, W. J., The effect of residual water on the survival of dried bacteria during storage, *Journal of General Microbiology*, v. 19, p.624-633, 1958.

Sgorbati, B; Biavati, B; Palenzona, D. The genus *Bifidobacterium*. Em Wood, B.J.B.; Holzapfel, W.H.(eds.). The Lactic Acid Bacteria, V.2. The genera of Lactic Acid Bacteria, cap.8, p.279-306, 1995, Blackie Academic, Londres.

Shahidi, F.; Han, X. Q. Encapsulation of food ingredients. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 33, n.6, p. 501- 547, 1993.

Shi, X-Y.; Tan, T-W. Preparation of chitosan/ethylcellulose complex microcapsule and its application in controlled release of Vitamin D2. Biomaterials, Oxford, v. 23, p. 4469-4473, 2002.

Shortt, C., The probiotic century: historical and current perspectives. Food Science ; Technology, New Holland, v.10, p. 411-417, 1999.

Silva, J.; Carvalho, A.S.; Teixeira, P.; Gibbs, P. A. Bacteriocin production by spray dried lactic acid bacteria. Letters Applied Microbiology, v.62, p. 47-55, 2002.

Sultana, K.; Godward, G.; Reynolds, N. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate – starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. International Journal of Food Microbiology, v. 62, n. 1-2, p. 47 – 55, 2000.

Tiebackx, F.W.Z., Gleichzeitige Ausflockung zweier Kolloide, Chem. Ind. Kolloide, V. 8, p. 198-201, 1911 apud Kruif, C.G.; Weinbreck, F; Vries, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides, Current Opinion in Colloid ; Interface Science, v. 9, p.340-349, 2004 apud Bungenberg de Jong H. G.; Kruyt H.R., Coacervation (partial miscibility in colloid systems), Proc. K. Ned. Akad.Wet. v.32, p. 849-856, 1929.

Vandegaer, J. E. Encapsulation by coacervation. In: Microencapsulation: Processes and applications. Vandegaer, J.E. ed. Plenum Press, New York, p. 21-37, 1974