

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Microencapsulação de *Bifidobacterium lactis* para aplicação em leites
fermentados

Alcina Maria Liserre

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco

São Paulo, 2005

Alcina Maria Liserre

Microencapsulação de *Bifidobacterium lactis* para aplicação em leites fermentados

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Bernadette Dora G. Melo Franco
orientador/presidente

Profa. Dra. Mariza Landgraf

Profa. Dra. Maria Inês Ré

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig

São Paulo, 19 de agosto de 2005.

*Aos meus pais, Geraldo (in memoriam) e Júlia,
e ao meu companheiro, Elizeu,
pelo amor e dedicação em
todos os momentos.*

Agradecimentos

À minha orientadora, **Prof^a Bernadette D. G. M. Franco**, pela orientação, confiança e por todo o apoio e dedicação.

À **Dra. Maria Inês Ré**, pelo apoio, orientação, amizade e fundamental colaboração na realização deste trabalho.

Às **Prof^{as} Dras. Mariza Landgraf e Maria Teresa Destro**, pelo apoio e pelos momentos agradáveis de convívio durante todos esses anos.

À **Kátia e Lúcia**, funcionárias do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pelo apoio, colaboração e amizade.

À **Maria Helena, Shirley, Marisa, Letícia, Juliana, Bergson e toda a equipe do Laboratório de Tecnologia de Partículas** do IPT que me acolheram de forma calorosa, com muita amizade e contribuição para a realização do meu trabalho.

Aos amigos do laboratório de microbiologia de alimentos: **Ângela, Antônio, Cecília, Cíntia, Cristina Cruz, Cristina Garcia, Cristiano, Eb, Gabriela, Gunnar, Hans, Jane, Janine, João, Kátia, Lina, Paulo, Patrícia Bettini, Patrícia Kary, Ricardo, Susana, Tatiana, Vanessa Tsu, Vanessa Vieira e Vinícius**, que tornaram a ida ao laboratório muito mais prazerosa.

À **Prof^a Susana Saad**, pelo auxílio e colaboração.

Ao **Jorge e Elaine**, funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, pela paciência e disposição.

Às secretárias **Tânia e Mônica**, pela colaboração e ajuda nos momentos necessários.

Aos meus amigos do Laboratório de Controle de Alimentos da Prefeitura de São Paulo, **Selma, Eliana, Sônia, Yara, Cecília, Neuza, Vera, Mauro, Ida, Sandra, Maria, Vanda, Celeste, Roberta, Isabel, Margarida, Luzia e muitos outros**, principalmente pela amizade e apoio.

Aos meus amigos pessoais, **Patrícia, Sá, Magda, Marcos, Paulo Sakanaka, Dulce, Áurea, Simone, Sônia, Galdino e Oscar**, que mesmo com o passar dos anos nunca me esquecem e continuam me proporcionando momentos maravilhosos.

À **minha família**, pelo carinho, amor e incentivo durante todas as etapas de minha vida.

À **FAPESP**, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de estudo através do processo 01/13095-2.

Ao **CNPq** pelo auxílio financeiro ao projeto através do processo 474863/2003-4.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
Resumo	xii
Abstract	xiv
1 Introdução Teórica.....	1
1.1 Bactérias probióticas	1
1.2 Técnicas de microencapsulação.....	5
1.3 Aplicação de polímeros entéricos e liberação controlada	9
1.4 Microencapsulação de bactérias probióticas.....	12
2 Objetivos	17
3 Materiais e Métodos	18
3.1 Reagentes.....	18
3.2 Culturas microbianas.....	18
3.3 Métodos microbiológicos	18
3.3.1 Seleção de meio de cultura para cultivo de <i>B. lactis</i>	18
3.3.2 Preparo do inóculo de <i>B. lactis</i> para a encapsulação.....	19
3.3.3 Enumeração de <i>B. lactis</i>	19
3.3.4 Avaliação de atividade antimicrobiana da quitosana.....	20
3.4 Preparo de micropartículas por atomização e gelificação.....	20
3.5 Caracterização das micropartículas.....	23
3.5.1 Microscopia óptica	23
3.5.2 Análise granulométrica.....	23
3.5.3 Determinação da concentração de cálcio	23
3.6 Avaliação da estabilidade das micropartículas e da liberação de <i>Bifidobacterium lactis</i> em tampão fosfato	24
3.7 Avaliação da liberação e sobrevivência de <i>B. lactis</i> em teste de simulação de fluidos gastrointestinais sem a adição de enzimas	24
3.8 Avaliação da sobrevivência de <i>Bifidobacterium lactis</i> microencapsulado após ação de suco gástrico e entérico formulados com pepsina, pancreatina e bile	25
3.9 Sobrevivência de células de <i>Bifidobacterium lactis</i> livres e microencapsuladas em leite fermentado	26
3.9.1 Preparo do leite fermentado.....	26
3.9.2 Avaliação da população de <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> em leite fermentado	26
3.9.3 Avaliação da sobrevivência de <i>B. lactis</i> em leite fermentado após passagem por teste de simulação de fluidos gastrointestinais com e sem a adição de enzimas	27

3.9.4	Determinação do pH	27
3.10	Análise estatística	28
4	Resultados e Discussão	29
4.1	Reativação e cultivo da cultura de <i>Bifidobacterium lactis</i>	29
4.2	Avaliação de atividade antimicrobiana da quitosana	29
4.3	Caracterização de micropartículas obtidas por atomização e geleificação.....	30
4.3.1	Resultados obtidos com a microscopia óptica, análise de tamanho de partícula e análise da concentração de cálcio	30
4.4	Avaliação da liberação de <i>Bifidobacterium lactis</i> das micropartículas em soluções tampão	39
4.5	Avaliação da liberação e sobrevivência de <i>B. lactis</i> em teste de simulação de fluidos gastrintestinais.....	43
4.5.1	Avaliação da liberação e sobrevivência de <i>B. lactis</i> em teste de simulação de fluidos gastrintestinais sem a adição de enzimas	44
4.5.2	Avaliação da liberação e sobrevivência de <i>B. lactis</i> em teste de simulação de fluidos gastrintestinais com a adição de enzimas	48
4.6	Efeito da microencapsulação na sobrevivência de <i>Bifidobacterium lactis</i> em leite fermentado e em leite fermentado submetido a condições simuladas do trato gastrintestinal ...	54
4.6.1	Sobrevivência de células de <i>Bifidobacterium lactis</i> livres e microencapsuladas em leite fermentado.....	55
4.6.2	Sobrevivência de células de <i>Bifidobacterium lactis</i> livres e microencapsuladas em leite fermentado submetido a condições simuladas de suco gástrico com e sem a adição de enzimas	60
5	Conclusões.....	70
6	Referências	71

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura química do Eudragit® (Vandamme *et al.*, 2002) 12
- Figura 2. Fotomicrografias das partículas de alginato secas e após 1, 5, 10, 15 e 30 min em tampão fosfato pH 7,5. 33
- Figura 3. Fotomicrografias de partículas de alginato-quitosana secas e após 1, 5, 10, 30 e 60 min em tampão fosfato pH 7,5. 34
- Figura 4. Fotomicrografias de partículas do tipo alginato-quitosana 2 etapas secas e após 1, 5, 10, 30 e 60 min em tampão fosfato pH 7,5. 35
- Figura 5. Fotomicrografias de partículas de alginato-quitosana-sureteric 1% secas e após 1, 5, 15, 20, 30 e 60 min em tampão fosfato pH 7,5. 36
- Figura 6. Fotomicrografias de partículas de alginato-quitosana-sureteric 0,1% secas e após 1, 10, 30, 45 e 60 min em tampão fosfato pH 7,5. 37
- Figura 7. Fotomicrografias de partículas de alginato-quitosana-acryl-eze 0,1% secas e após 1, 15, 30 e 60 min em tampão fosfato pH 7,5. 38
- Figura 8. Populações de *B. lactis* (log UFC/g) liberadas de partículas de alginato, alginato-quitosana, alginato-quitosana-sureteric 0,1% e alginato-quitosana-acryl-eze 0,1% após 60 min a 37°C em soluções tampão pH 4,5, 6,0 e 7,5 a 37°C..... 41
- Figura 9. Populações de *B. lactis* (log UFC/g) liberadas das partículas e de microrganismos não encapsulados (log UFC/ml), expostos a pH 1,5 de 0 a 120 min, posteriormente a pH 5,6 de 121 a 240 min e finalmente a pH 7,5 de 241 a 360 min, 37°C..... 47
- Figura 10. Populações de *B. lactis* (log UFC/g) liberadas das partículas e de microrganismos não encapsulados (log UFC/ml), expostos a pH 1,5 de 0 a 120 min, posteriormente a pH 5,6 de 121 a 240 min e finalmente a pH 7,5 de 241 a 360 min, 37°C, com adição de pepsina e lipase no tampão pH 1,5 e de pancreatina e bile nos tampões pH 5,6 e 7,5. 53
- Figura 11. População de células de *B. lactis* (logUFC/mL) liofilizadas (A), desidratadas (B), encapsuladas em alginato-quitosana (C) e encapsuladas em alginato-quitosana-acryl-eze (D) em leite fermentado após 0, 1, 2, 3 e 4 semanas de estocagem em refrigeração..... 59
- Figura 12. População de células de *B. lactis* (log UFC/mL) liofilizadas (A), desidratadas (B), encapsuladas em alginato-quitosana (C) e encapsuladas em alginato-quitosana-acryl-eze (D) em leite fermentado estocado por 0, 1, 2, 3 e 4 semanas sob refrigeração, após tratamento com fluidos gastrintestinais simulados (pH 1,5-5,6-7,5, 37°C, 150rpm, 360 min) com adição de pepsina na solução pH 1,5 e de pancreatina e bile nas soluções pH 5,6 e pH 7,5. 65

Figura 13. População de células liofilizadas de *B. lactis* (log UFC/mL) em leite fermentado estocado por 0, 1, 2, 3 e 4 semanas sob refrigeração, após exposição a pH 1,5 com 30 e 120 min, posteriormente a pH 5,6 de 121 a 240 min e finalmente a pH 7,5 de 241 a 360 min (37°C, 150 rpm), simulando um tratamento com fluidos gastrintestinais com adição de enzimas e bile (pepsina e lipase no tampão pH 1,5 e pancreatina e bile nos tampões pH 5,6 e 7,5)..... 66

Figura 14. População de células desidratadas de *B. lactis* (log UFC/mL) em leite fermentado estocado por 0, 1, 2, 3 e 4 semanas sob refrigeração, após exposição a pH 1,5 com 30 e 120 min, posteriormente a pH 5,6 de 121 a 240 min e finalmente a pH 7,5 de 241 a 360 min (37°C, 150 rpm), simulando um tratamento com fluidos gastrintestinais com adição de enzimas e bile (pepsina e lipase no tampão pH 1,5 e pancreatina e bile nos tampões pH 5,6 e 7,5). 67

Figura 15. População de células de *B. lactis* (log UFC/mL) encapsuladas com alginato-quitosana em leite fermentado estocado por 0, 1, 2, 3 e 4 semanas sob refrigeração, após exposição a pH 1,5 com 30 e 120 min, posteriormente a pH 5,6 de 121 a 240 min e finalmente a pH 7,5 de 241 a 360 min (37°C, 150 rpm), simulando um tratamento com fluidos gastrintestinais com adição de enzimas e bile (pepsina e lipase no tampão pH 1,5 e pancreatina e bile nos tampões pH 5,6 e 7,5).. 68

Figura 16. População de células de *B. lactis* (log UFC/mL) encapsuladas com alginato-quitosana-acryl-eze em leite fermentado estocado por 0, 1, 2, 3 e 4 semanas sob refrigeração, após exposição a pH 1,5 com 30 e 120 min, posteriormente a pH 5,6 de 121 a 240 min e finalmente a pH 7,5 de 241 a 360 min (37°C, 150 rpm), simulando um tratamento com fluidos gastrintestinais com adição de enzimas e bile (pepsina e lipase no tampão pH 1,5 e pancreatina e bile nos tampões pH 5,6 e 7,5). 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de pH no trato gastrintestinal humano.....	11
Tabela 2. Identificação e descrição dos ensaios de microencapsulação por atomização realizados.....	21
Tabela 3. Diâmetro médio das partículas obtidas por diferentes procedimentos de encapsulação.....	32
Tabela 4. Populações de <i>Bifidobacterium lactis</i> (log UFC/g) em partículas tratadas com tampão fosfato pH 4,5, 6,0 e 7,5.	41
Tabela 5. População de <i>B. lactis</i> encapsulado e não encapsulado após exposição a pH 1,5 de 0 a 120 min, posteriormente a pH 5,6 de 121 a 240 min e finalmente a pH 7,5 de 241 a 360 min, 37°C.....	46
Tabela 6. Populações de <i>B. lactis</i> encapsulado e não encapsulado após exposição a pH 1,5 de 0 a 120 min, posteriormente a pH 5,6 de 121 a 240 min e finalmente a pH 7,5 de 241 a 360 min, 37°C com adição de enzimas do trato gastrintestinal (pepsina e lipase no tampão pH 1,5 e pancreatina e bile nos tampões pH 5,6 e 7,5).	52
Tabela 7. População de <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> e <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> em leite fermentado (log UFC/ml) durante 4 semanas de armazenamento sob refrigeração.....	58
Tabela 8. População de células de <i>B. lactis</i> (log UFC/mL) liofilizadas (A), desidratadas (B), encapsuladas em alginato-quitosana (C) e encapsuladas em alginato-quitosana-acryl-eze (D) em leite fermentado antes e após exposição a suco gástrico simulado (37°C, 150rpm) sem adição de enzimas gástricas e entéricas com 0, 1, 2, 3 e 4 semanas de estocagem em refrigeração.	63
Tabela 9. População de células de <i>B. lactis</i> (log UFC/mL) liofilizadas (A), desidratadas (B), encapsuladas em alginato-quitosana (C) e encapsuladas em alginato-quitosana-acryl-eze (D) em leite fermentado antes e após exposição a suco gástrico simulado (37°C, 150rpm) com adição de pepsina e lipase no tampão pH1,5 e de pancreatina e bile nos tampões pH5,6 e 7,5 com 0, 1, 2, 3 e 4 semanas de estocagem em refrigeração.....	64

Resumo

Bifidobacterium spp. são microrganismos probióticos que podem ser incorporados em produtos alimentícios. Entretanto, para que seus efeitos benéficos à saúde humana ocorram, é necessário que o número de células viáveis na hora do consumo seja, no mínimo, 10^6 UFC/g. As bifidobactérias são sensíveis à elevada acidez e, por isso, torna-se necessária a busca por métodos que possam proteger a integridade da célula, sendo um deles a microencapsulação. Em uma primeira etapa do trabalho, *Bifidobacterium lactis* foi encapsulado em micropartículas de alginato e alginato modificado (alginato-quitosana, alginato-quitosana-sureteric e alginato-quitosana-acryl-eze) e sua sobrevivência e liberação das micropartículas em fluidos simulados do trato gastrointestinal foram mensuradas utilizando-se soluções tampão com pH 1,5, 5,6 e 7,5, na presença e na ausência de pepsina (3g/L), pancreatina (1g/L) e bile (10g/L). A liberação de células das micropartículas teve uma relação direta com o pH do tampão. A microencapsulação aumentou a taxa de sobrevivência de *B. lactis*, em comparação com células não encapsuladas, em soluções tampão com pH 1,5 sem a presença de enzimas. Em suco gástrico simulado com enzimas digestivas, por outro lado, foi observado que a pepsina proporcionou um efeito protetor sobre as células de *B. lactis*, e nesse caso, as taxas de sobrevivência do microrganismo estavam diretamente relacionadas com o grau de injúria das células. Em uma segunda etapa do trabalho, leites fermentados com *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* foram enriquecidos com culturas de *Bifidobacterium lactis* submetidas a quatro tratamentos diferentes: desidratação em temperatura ambiente, liofilização/congelamento, encapsulação em alginato-quitosana e encapsulação em alginato-quitosana-acryl-eze. A população sobrevivente de *B. lactis* foi determinada semanalmente no leite fermentado e também após tratamento simulando condições do trato gastrointestinal. Os

resultados indicaram que na ausência de pepsina, as populações de *B. lactis* foram reduzidas drasticamente após o contato com tampão pH 1,5, não sendo possível a detecção de células viáveis livres ou encapsuladas após 120 minutos de teste. A presença de pepsina influenciou positivamente a recuperação de células viáveis de *B. lactis* em todas as condições testadas, mas as culturas na forma desidratada apresentaram melhores resultados que as culturas microencapsuladas ou liofilizadas. No caso do leite fermentado contendo as células desidratadas, a população de *B. lactis*, após o tratamento em suco gástrico com enzimas, foi superior à detectada no produto antes desse tratamento. Conclui-se que a microencapsulação não foi eficiente para proteger *B. lactis* em leite fermentado contra injúrias causadas pelo trato gastrointestinal simulado.

Palavras-chave: *Bifidobacterium lactis*, microencapsulação, leite fermentado, suco gástrico

Abstract

Bifidobacterium spp. are microorganisms that can be added to foods. However, the benefits for the human health occur when the numbers of viable cells in the moment of the consumption is at least 10^6 CFU/g. Bifidobacteria are acid sensitive, and methods to protect cell integrity, such as microencapsulation, are needed. In the first part of the present study, *Bifidobacterium lactis* was encapsulated in microparticles of alginate and modified alginate (alginate-chitosan, alginate-chitosan-sureteric and alginate-chitosan-acryl-eze) and the survival and release from microparticles in simulated gastrointestinal conditions were measured, using buffers (pH 1.5, 5.6 and 7.5), in the absence and presence of pepsin (3g/L), pancreatin (1g/L) and bile. The release from microparticles presented a direct relationship with pH. When the pH was 1.5 and no enzyme was present, encapsulation improved the survival of *B. lactis*, when compared to free cells. However, pepsin had a protective effect on *B. lactis*, and the survival rate was directly related to the cells injury degree. In the second part of the study, fermented milk samples containing *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* were supplemented with *B. lactis* submitted to four different treatments: dehydration at room temperature, freeze drying, encapsulation in alginate-chitosan and encapsulation in alginate-chitosa-acryl-eze. The number of viable *B. lactis* cells in the fermented milk was determined weekly and also after treatment with simulated gastrointestinal conditions. Results indicated that in the absence of pepsin, the number of viable cells decreased significantly after contact with buffers (pH 1.5), and no viable cell was detected after 120 minutes. Pepsin improved the recovery of viable cells in the assayed gastric conditions, being the dehydrated cultures more resistant than other cultures. In fermented milk containing the dehydrated cells, the number of viable cells increased after treatment with simulated gastrointestinal fluids.

Microencapsulation was not an effective procedure to protect *B. lactis* in fermented milk against injury caused by the simulated gastrointestinal tract.

Keywords: *Bifidobacterium lactis*, microencapsulation, fermented milk, gastrointestinal tract

1 Introdução

1.1 Bactérias probióticas

O consumo de produtos probióticos no Brasil intensificou-se consideravelmente nos últimos anos. Esse fato pode ser confirmado pelo desenvolvimento de novas marcas por diferentes indústrias alimentícias. A estratégia de *marketing* dessas empresas envolve o apelo pela manutenção da saúde e a necessidade da ingestão de uma pequena dose diária do alimento funcional (Oliveira *et al.*, 2002).

Na Europa, alimentos funcionais que visam a saúde intestinal também se tornaram uma tendência de mercado. O mercado para iogurtes probióticos já está bem estabelecido, mas recentemente, o setor de maior crescimento é o das bebidas lácteas probióticas. A popularidade das bebidas probióticas com pequenas doses diárias tem também resultado em novas pesquisas para desenvolver outros tipos de alimentos com probióticos (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002). No Japão e na Coreia, o uso de probióticos é comum em produtos alimentícios que são formulados especialmente para resistir ao processo de digestão. Nos Estados Unidos, os probióticos são geralmente encontrados em suplementos e iogurtes. Fabricantes que desejam expandir o uso de probióticos precisam garantir a estabilidade do produto e melhorar a taxa de sobrevivência para garantir o benefício à saúde do consumidor (Siuta-Cruce e Goulet, 2001).

O conceito de probióticos foi desenvolvido no início do século XX pelo cientista russo Elie Metchnikoff, ganhador do Prêmio Nobel em 1908, que sugeriu que a vida saudável e longa de camponeses búlgaros resultava do consumo de produtos lácteos fermentados. Ele acreditava que os bacilos fermentadores (*Lactobacillus*) ingeridos influenciavam positivamente a microbiota do intestino. De acordo com Metchnikoff, bactérias benéficas vivas precisavam ser ingeridas de forma regular através de leites fermentados para manter um bom equilíbrio da microbiota intestinal e minimizar fermentações putrefativas.

Probióticos são microrganismos vivos, que após a ingestão em determinado número, desempenham um efeito benéfico adicional para a saúde além da nutrição básica (Guarner e Schaafsma, 1998, Sanders, 1999, Siuta-Cruce e Goulet, 2001). Várias outras definições têm sido propostas, mas não há um consenso para uma definição final.

Efeitos benéficos à saúde têm sido associados a células microbianas vivas, mas freqüentemente é difícil diferenciar os efeitos das próprias células dos efeitos de seus metabólitos (Siuta-Cruce e Goulet, 2001). Segundo Krasaekoopt *et al.* (2003), as culturas de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, normalmente utilizadas na produção de iogurtes, produzem β -galactosidase, beneficiando o metabolismo da lactose do iogurte ou leite fermentado, mas não podem ser consideradas probióticas porque são incapazes de sobreviver e se multiplicar no trato intestinal devido a sua baixa tolerância aos sais biliares. Por outro lado, bactérias probióticas como *L. acidophilus* e *B. bifidum* podem sobreviver e multiplicar-se no trato gastrintestinal, produzindo β -galactosidase mesmo na presença de bile.

Para uma bactéria ser considerada probiótica, deve-se considerar não apenas as suas características benéficas, mas também a ausência de patogenicidade. Além disso, bactérias probióticas não devem conferir sabor e textura indesejáveis no produto. Vários aspectos, como segurança, funcionalidade e características tecnológicas devem ser levados em consideração no processo de seleção de microrganismos probióticos. Aspectos de segurança incluem as especificações de origem (trato gastrintestinal humano e saudável), não-patogenicidade e características de resistência a antibióticos. Aspectos funcionais incluem a viabilidade e a persistência no trato gastrintestinal, propriedades de antagonismo e antimutagenicidade. Características tecnológicas incluem a facilidade de aplicação no alimento e do processo de fermentação, e também características sensoriais aceitáveis pelo consumidor. Entretanto, até mesmo o melhor probiótico é limitado na imensa amplitude de possíveis aplicações. Muitas bactérias com propriedades funcionais excepcionais são descartadas devido a limitações tecnológicas (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002). Uma dificuldade para a aplicação de bactérias probióticas em leites fermentados é a lenta taxa de

multiplicação dessas bactérias em leite, principalmente devido à sua baixa atividade proteolítica. Outro problema é a possível inibição das bactérias probióticas pelas culturas tradicionais do iogurte (Mccomas e Gilliland, 2003).

As bactérias probióticas mais estudadas incluem espécies do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Sanders, 1999). Como exemplo, pode-se citar *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. brevis*, *L. cellobiosus*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. infantis*, *B. longum*, e *B. lactis*, entre outros. Em termos gerais, microrganismos probióticos devem apresentar algumas propriedades importantes no intestino humano, como: (i) aderir às células do intestino; (ii) excluir ou reduzir a aderência de microrganismos patogênicos; (iii) sobreviver e multiplicar-se; (iv) produzir ácidos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas contra microrganismos patogênicos; (v) não ser invasivos, carcinogênicos ou patogênicos; (vii) manter um equilíbrio com a microbiota normal (Reid, 1999).

Entre os benefícios gerados pelos probióticos, pode-se citar controle de infecções intestinais, controle do nível de colesterol, melhoramento da digestão da lactose e, possivelmente, atividade anticarcinogênica. Bactérias probióticas podem inibir o desenvolvimento de microrganismos patogênicos que podem ser encontrados no trato gastrintestinal, devido à produção de ácido e/ou de bacteriocinas, à competição por nutrientes com possíveis microrganismos patogênicos e ao melhoramento do sistema imune. Por produzirem β -galactosidase, bactérias probióticas são benéficas para pessoas com intolerância à lactose. A atividade anticarcinogênica ou antimutagênica dos probióticos pode resultar de um ou mais fatores, como inibição de carcinógenos e/ou pró-carcinógenos, ativação do sistema imunológico do hospedeiro e redução do pH intestinal, tendo como consequência redução da atividade microbiana. Além disso, outros efeitos, como a redução do colesterol sanguíneo, têm sido relatados, especialmente por cepas de *L. acidophilus* (Krasaekoopt *et al.*, 2003).

Sabendo-se que microrganismos probióticos desempenham um papel importante promovendo e mantendo a saúde, muitos pesquisadores e empresas têm demonstrado interesse em incorporá-los a produtos alimentícios e farmacêuticos (Gardner *et al.*, 2000). Recomenda-se que produtos adicionados de

probióticos contenham, no mínimo, uma contagem de 10^7 bactérias probióticas por grama ou mililitro (Ishibashi e Shimamura, 1993).

Em muitos países, existem padrões para contagem mínima de bactérias probióticas em produtos fermentados. Nos países pertencentes ao MERCOSUL (Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina), a regulamentação estabelece que a concentração mínima para probióticos em leites fermentados deve ser de 10^6 UFC/g. No Brasil, uma resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabelece que leites fermentados à base de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* devem conter um mínimo de 10^6 UFC/grama de produto durante o prazo de validade (BRASIL, 1999). No Japão, a Associação de Leites Fermentados e Bactérias Lácticas estabeleceu uma norma que requer um mínimo de 10^7 células por mililitro em produtos lácteos frescos (Krasaekoopt *et al.*, 2003).

A capacidade dos microrganismos de sobreviver e multiplicar-se em hospedeiros influencia diretamente os seus benefícios probióticos. As bactérias devem se manter metabolicamente estáveis e ativas no produto, sobreviver à passagem através do trato digestivo, e ainda, causar os efeitos benéficos esperados no intestino do hospedeiro (Gilliland, 1989). Entretanto, estudos indicam que as bactérias lácticas não sobrevivem adequadamente quando incorporadas em produtos lácteos fermentados, devido à própria acidez do produto (Dave e Shah, 1996; Kailasapathy e Rybka, 1997, Shah e Lankaputhra, 1997; Oliveira *et al.*, 2002). Em uma pesquisa realizada por Fantazzini *et al.* (2000), empregando-se leites fermentados de quatro marcas comerciais diferentes adquiridos no comércio de São Paulo dentro do prazo de validade, observou-se uma variação média de 2,7 ciclos logarítmicos (log) nas populações de bactérias lácticas (UFC/ml), verificando-se amostras com 8,4 log UFC/ml até amostras com 5,7 log UFC/ml. Resultados obtidos por Trindade (2001), que inocularam *Bifidobacterium lactis* em iogurte com pH inicial de 4,2, indicaram uma redução de 7 ciclos logarítmicos após 28 dias de estocagem a 7°C.

A viabilidade e a estabilidade de culturas probióticas têm sido um desafio tecnológico para as indústrias processadoras. Alimentos probióticos devem conter linhagens específicas de microrganismos probióticos e manter um nível apropriado

de células viáveis durante a vida-de-prateleira do produto, sem interferir no sabor e textura, e preferencialmente, não se multiplicar (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002).

Se a atividade de bactérias probióticas no trato digestivo depende de sua sobrevivência nesse ambiente, então essas bactérias devem ser resistentes aos mecanismos de defesa do hospedeiro, incluindo os processos dinâmicos fisiológicos e fisicoquímicos do trato gastrointestinal (GI). Os parâmetros fisiológicos compreendem pH, concentração de enzimas gástricas e do intestino delgado, bile, e a cinética da passagem do quimo através do estômago e do intestino. Embora essas bactérias tenham sido isoladas de vários pontos do trato GI humano, o íleo e o cólon parecem ser os locais preferenciais de sua colonização no intestino. Infelizmente, a maior parte dos estudos sobre ação dos probióticos ignora esses fatos e, como resultado, dados sobre a tolerância de bactérias probióticas às secreções do intestino delgado, além da bile, não são avaliados (Kos *et al.*, 2000).

Muitas propostas tecnológicas e soluções inovadoras têm sido investigadas para resolver os problemas de estabilidade e viabilidade em novos desenvolvimentos de alimentos. Novas formulações e tecnologias de microencapsulação têm aumentado a resistência dos microrganismos com resultados promissores. A manutenção de baixos custos ainda é um desafio para o processamento de probióticos e para as tecnologias de formulação (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002).

1.2 Técnicas de microencapsulação

Microencapsulação é a tecnologia de empacotamento que, com finas camadas poliméricas aplicáveis a sólidos, gotículas de líquido ou materiais gasosos forma partículas denominadas microcápsulas, que podem liberar seu conteúdo com velocidade e condições específicas (Santos *et al.*, 2000). Essa técnica é muito útil na fabricação de medicamentos, principalmente quando se deseja que uma substância não seja afetada pelo suco gástrico, sendo absorvida apenas no intestino. A microencapsulação também pode ser utilizada para a proteção de células microbianas com dois propósitos: aumentar a porcentagem de

células íntegras após determinado tempo de vida-de-prateleira em alimentos e proteger a célula bacteriana da ação de sucos gástrico e entérico.

A tecnologia de imobilização de células tem sido amplamente utilizada em várias pesquisas e aplicações industriais. O uso de bactérias lácticas imobilizadas como culturas *starter* na indústria de laticínios é uma das mais promissoras aplicações. A encapsulação com polímeros sintéticos ou naturais é uma das técnicas mais utilizadas devido a sua facilidade e simplicidade de aplicação, baixo custo, e condições de retenção de altas contagens de células viáveis (Zhou *et al.*, 1998).

As técnicas de encapsulação aplicadas aos probióticos para uso em leites fermentados podem ser classificadas em dois grupos: extrusão (método de gotejamento) e emulsificação ou sistema de duas fases (Krasaekoopt *et al.*, 2003).

A extrusão é a forma mais antiga e comum de se fazer cápsulas com hidrocolóides. O polímero mais utilizado para o método de extrusão é o alginato, que é um heteropolissacarídeo linear de ácidos D-manurônico e L-gulurônico extraído de várias espécies de algas (Yang e Wright, 1999). Dependendo da alga, o teor e a seqüência dos ácidos D-manurônico e L-gulurônico nos polímeros podem variar consideravelmente. As propriedades funcionais do alginato como um polímero protetor correlacionam-se fortemente com a seqüência de ácido D-manurônico e ácido L-gulurônico. Cátions divalentes como Ca^{2+} ligam-se preferencialmente ao polímero de ácido L-gulurônico. O comprimento do polímero de ácido D-manurônico é a característica mais importante para a formação do hidrocolóide (Yang e Wright, 1999, Krasaekoopt *et al.*, 2003).

Para a formação de partículas pelo método de extrusão, uma suspensão de células é misturada com uma solução de alginato de sódio, e a mistura é gotejada ou atomizada, através de uma seringa ou bico injetor, em uma solução com cátions multivalentes (geralmente Ca^{2+} na forma de CaCl_2). As gotas formam esferas de gel instantaneamente, encapsulando as células em uma estrutura tridimensional no alginato com ligações cruzadas através de íons. Portanto, forma-se uma partícula multinucleada, com o agente ativo disperso em seu interior. O sucesso da técnica de encapsulação em gel de alginato é devido ao pouco ou nenhum grau de injúria proporcionado ao material recoberto, ao baixo custo, à

simplicidade do processo e à biocompatibilidade entre os polímeros e os microrganismos. As concentrações de alginato e cloreto de cálcio utilizadas variam de 0,6% a 2% e 0,05 a 1,5M, respectivamente (Curt, 1995, Yang e Wright, 1999, Krasaekoopt *et al.*, 2003). O tamanho e o formato das partículas dependem da viscosidade da solução de alginato, da agitação do meio de cura (solução com cátions multivalentes) e da distância entre o bico atomizador e a solução de cloreto de cálcio. O gotejamento pode resultar em partículas de 1 a 4 mm, enquanto a atomização, em gotas de 100 a 600 μ m (Sugawara *et al.*, 1994). A composição do alginato também influencia no tamanho das partículas, o uso de alginato com baixa concentração de ácido gulurônico resulta em partículas menores (Krasaekoopt *et al.*, 2003).

A técnica de emulsificação consiste na adição de um pequeno volume de suspensão célula-polímero (fase descontínua) a um grande volume de óleo vegetal (fase contínua), como óleo de soja, canola, girassol ou de milho. A mistura é homogeneizada para a formação de uma emulsão água-em-óleo. Logo que a emulsão é formada, o polímero precisa ser insolubilizado para a formação de ligações cruzadas e de pequenas partículas na fase óleo. Quanto menor o tamanho das partículas durante a emulsificação, menor o tamanho das partículas formadas no final do processo, ou seja, após a quebra da emulsão. O tamanho das partículas também pode ser controlado com a velocidade de agitação, e pode variar entre 25 μ m e 2mm. O método de insolubilização depende do tipo de material usado. As partículas são retiradas do óleo por filtração. Embora sejam usadas com sucesso para a encapsulação de bactérias lácticas para fermentação contínua ou em batelada (Krasaekoopt *et al.*, 2003), técnicas de emulsão não são muito adequadas para aplicação industrial, pois geralmente resultam na formação de partículas de tamanhos muito variáveis. Além disso, são de difícil execução, devido à dificuldade da dissolução do Ca^{2+} na fase oleosa e da eliminação do óleo da superfície das partículas (Poncelet *et al.*, 1995, Stormo e Crawford, 1992).

Enquanto altas concentrações de células podem ser encontradas em partículas de alginato (10^9 - 10^{10} UFC/g), a quantidade de células fora do gel pode ser também elevada (até 10^8 UFC/ml). Em algumas aplicações, como cremes fermentados para produção de manteiga com certas culturas ou queijo cottage, a

liberação de células é indesejável, uma vez que as células livres podem provocar uma acidificação continuada durante a estocagem (Champagne *et al.*, 1993, Zhou *et al.*, 1998).

Com a finalidade de aumentar a retenção do material encapsulado e a estabilidade das partículas feitas com alginato de cálcio, pode-se recobrir estas partículas com polímeros policatiônicos que formam uma membrana na superfície das gotas, complexando-se com os agrupamentos do alginato (Huguet e Dellacherie, 1996). O alginato forma complexos estáveis com policátions como a quitosana e a polilisina. A quitosana, um policátion com grupos amina, pode sofrer ligações cruzadas com o poliânion alginato, reforçando a camada exterior da partícula. A polilisina é um produto muito mais caro que a quitosana e a sua ligação com o alginato é mais fraca do que a ligação entre alginato e quitosana (Lee *et al.*, 1997).

A quitosana é um polissacarídeo positivamente carregado formado pela deacetilação da quitina extraída de crustáceos. A quitina é o segundo mais abundante biopolímero natural existente no planeta, ficando atrás apenas da celulose. A estrutura química da quitina é parecida com a celulose, sendo formada com monômeros 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glicose (NAG) com ligações $\beta(1\rightarrow4)$. Quitosana é a forma deacetilada (em vários graus) da quitina, a qual, ao contrário da quitina, é solúvel em soluções ácidas (pH <6,0). Quitina e quitosana têm sido alvo de pesquisas para uma série de aplicações industriais. Entre suas possíveis aplicações, pode-se citar preservação de alimentos da deterioração microbiana, formação de filmes biodegradáveis, recobrimento de resíduos da indústria de alimentos, purificação de água e clarificação e acidificação de sucos de frutas (Shahidi *et al.*, 1999).

Zhou *et al.* (1998) descobriram que, suspendendo partículas de alginato em uma solução de quitosana de baixo peso molecular, houve a formação de uma membrana capaz de reduzir a liberação de células na ordem de 100 vezes. Foi observado que a quitosana de baixo peso molecular difunde-se melhor no gel de alginato, resultando em uma membrana mais densa do que aquelas formadas com quitosana de alto peso molecular.

As partículas de alginato-quitosana podem ser produzidas por diferentes procedimentos. O processo pode ser feito em uma única etapa, com o gotejamento de uma solução de alginato de sódio em uma solução de CaCl_2 contendo quitosana, ou em duas etapas, onde uma solução de alginato de sódio é gotejada em uma solução de CaCl_2 , sendo posteriormente transferida para uma solução de quitosana (0,1 a 0,8%) onde ocorrerá a formação da membrana na superfície das gotas. Uma outra forma consiste no gotejamento da solução de alginato de sódio em uma solução de quitosana com posterior adição de CaCl_2 . Esses procedimentos resultam em partículas com resistência mecânica, porosidade, tamanho, intumescimento, permeabilidade e taxas de liberação característicos (Gaserød *et al.*, 1999, Zimmermann, 2001).

1.3 Aplicação de polímeros entéricos e liberação controlada

Para que um sistema de liberação controlada no organismo humano seja eficiente, primeiramente deve-se conhecer as características dos fluidos que irão entrar em contato com as partículas e avaliar a sua resistência em função do pH do meio, atuação de enzimas, temperatura e tempo de reação.

O trato gastrintestinal (TGI) começa na abertura da boca e termina com o ânus. O trato gastrintestinal pode ser dividido em boca, esôfago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, cólon e reto. Quando o objetivo é a absorção através do trato gastrintestinal, há uma quantidade de pontos anatômicos, fisiológicos e bioquímicos que devem ser considerados. Há algumas regiões do TGI com papéis únicos no processo seqüencial de assimilação de nutrientes: mastigação, salivação, deglutição, digestão, absorção e eliminação de alimentos (Mrsny, 1997).

O suco gástrico é, normalmente, um líquido amarelo pálido de elevada acidez (0,2 a 0,5% de HCl) e pH em torno de 1,5 a 3,5. Além do ácido clorídrico, contém: mucina, proteína com capacidade de se combinar com o ácido exercendo uma ação protetora da mucosa; fator intrínseco, essencial para a absorção de vitamina B_{12} ; enzimas (pepsinogênio, pepsina); hormônio gastrina; e água, 97 a 99% em peso (Guyton, 1993).

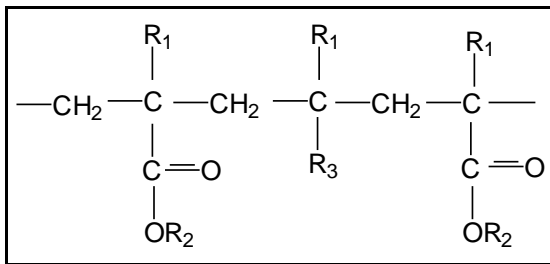
Com o desenvolvimento de probióticos microencapsulados a serem liberados no intestino, torna-se necessário que as micropartículas cheguem intactas até o duodeno. As partículas devem primeiro passar pelo estômago, e quando em contato com os fluidos intestinais sofrer solubilização ou desintegração parcial para propiciar a liberação das células. Os métodos para melhorar a liberação controlada no intestino são baseados na modificação química ou tecnológica do recobrimento da partícula. A aplicação de polímeros com solubilidade pH-dependente, ou aqueles degradados especificamente pela microbiota colonizadora, torna possível essa liberação controlada. Polímeros que possibilitam uma liberação controlada no intestino após a passagem pelo suco gástrico podem ser denominados como polímeros entéricos.

As várias estratégias desenvolvidas para atingir este objetivo têm aproveitado as características específicas do organismo humano, como por exemplo, pH (Tabela 1), microbiota, enzimas, potencial redox e tempo de trânsito. Entretanto, esses parâmetros podem variar entre diferentes indivíduos. O trânsito gastrintestinal envolve a passagem através do estômago (pH 1,5 a 3,5) e do intestino (pH 4,0 a 7,5). A maior parte dos polímeros com funcionalidade entérica são desenvolvidos para que sejam especificamente dissolvidos em função do pH intestinal. Esses polímeros entéricos, em geral, são insolúveis em valores de pH abaixo de 5,5 e solúveis em valores de pH acima de 6,0. Como exemplo, pode-se citar o Eudragit[®], composto por polímeros de ácido metacrílico, metilmetacrilato e etilacrilato (Figura 1) e o Sureteric[®], composto por polivinilacetatoftalato (Zak, 1997, Vandamme *et al.*, 2002). Neste trabalho utilizou-se o Sureteric[®], insolúvel em valores de pH inferiores a 4,5, e o Acryl eze[®], um produto a base de Eudragit[®] L100-55 e insolúvel em valores de pH inferiores a 5,5.

Tabela 1. Valores de pH no trato gastrintestinal humano.

Trato gastrintestinal	Comprimento	Tempo de residência	pH aproximado	Atividades
Cavidade oral	----	segundos a minutos	6,5	Polissacaridasas
Esôfago	23-25 cm	segundos	----	
Estômago	0,25 m (variável)	90 min (variável)	1,5-3,5	Proteases, lípases
Duodeno	0,35 m	30-40 min	4,0-5,5	Polisacaridasas, oligosacaridasas, proteases, peptidasas, lipases
Jejuno	2,8 m	1,5 a 2,0 h	5,5-7,0	Oligosacaridasas, peptidase, lipases
Íleo	4,2 m	5-7 h	7,0-7,5	Oligosacaridasas, peptidase, lipases
Cólon e Reto	1,5 m	1-60 h (média de 35-36h)	7,0-7,5	Várias enzimas bacterianas

Fonte: Mrsny, 1997.



R₁= -CH₃, R₂=-CH₃ e R₃=-COOH (Eudragit® L e S)

R₁= -CH₃, R₂=-CH₂-CH₃ e R₃=-COOH (Eudragit® L100-55 e L30D-55)

R₁= -CH₃, R₂=-CH₃ e R₃=-COOCH₃ (Eudragit® NE30D)

R₁= -CH₃, R₂=-CH₃ e R₃=-COOCH₂CH₂N⁺(CH₃)₃Cl⁻ (Eudragit® RL e RS)

Figura 1. Estrutura química do Eudragit® (Vandamme *et al.*, 2002)

Para melhorar a liberação pH-dependente, esses polímeros entéricos podem ser utilizados para o recobrimento de partículas ou simplesmente associados com polissacarídeos, como alginato e quitosana, para constituir sistemas de liberação controlada.

1.4 Microencapsulação de bactérias probióticas

A proteção de probióticos pela microencapsulação em partículas de hidrocolóides tem sido estudada para melhorar a viabilidade das células nos produtos alimentícios e no trato intestinal. Benefícios adicionais incluem: proteção de células nas partículas contra bacteriófagos; aumento da sobrevivência no caso de liofilização e congelamento e aumento da estabilidade durante a estocagem. Bactérias probióticas encapsuladas podem ser utilizadas em muitos tipos de produtos fermentados, como iogurte, queijo, cremes fermentados e doces lácteos gelados (Krasaekoopt *et al.*, 2003).

Vários pesquisadores têm avaliado a microencapsulação com o objetivo de reduzir a injúria ou morte celular de bactérias probióticas em leites fermentados ou em soluções de suco gástrico. Todavia, os resultados obtidos têm sido

contraditórios e o elevado número de parâmetros avaliados dificulta a identificação do método de microencapsulação mais eficiente.

Sheu e Marshall (1993) observaram que bactérias lácticas encapsuladas com alginato de cálcio foram totalmente liberadas através de agitação em solução de tampão fosfato 0,1M (pH 7,5) por 10 min. A taxa de sobrevivência de lactobacilos congelados em leite aumentou 40% quando foram utilizados microrganismos encapsulados.

Sultana *et al.* (2000) encapsularam *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. com uma mistura de alginato 2% preparada com 2% de amido de milho (*Hi-maize*, um prebiótico). As bactérias encapsuladas, no entanto, não mostraram um aumento significativo na sobrevivência quando sujeitas à alta acidez e sais de bile.

Lee e Heo (2000) imobilizaram *Bifidobacterium longum* KCTC 3128 e HLC 3742 independentemente em microcápsulas obtidas com 2, 3 e 4% de alginato de sódio. Quando as bactérias encapsuladas foram expostas a suco gástrico e solução de sais de bile *in vitro*, a taxa de morte nas células encapsuladas decresceu proporcionalmente ao aumento da concentração de alginato de sódio e do tamanho da partícula formada.

Shah e Ravula (2000) encapsularam bactérias probióticas (*Lactobacillus acidophilus* MJLA1 e *Bifidobacterium* spp. BDBB2) em alginato de cálcio por um sistema de duas fases (emulsão água/óleo). Os efeitos do lauril sulfato de sódio e Tween 80 sobre o tamanho das cápsulas e sobre a liberação dos microrganismos das cápsulas na presença de ácido e bile foram investigados. As bactérias encapsuladas foram liberadas com agitação em tampão fosfato 0,1 M por 5 min e na presença de bile, mas não na presença de ácido láctico. Em geral, a sobrevivência de bactérias probióticas em produtos lácteos fermentados congelados foi melhorada com a encapsulação.

Favaro-Trindade e Grosso (2000, 2001, 2002) encapsularam *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* em alginato de cálcio e em acetatoftalato de celulose. Nesse trabalho, concluiu-se que a imobilização em alginato de sódio não foi eficaz na proteção às células de *L. acidophilus* e *B. lactis* em soluções ácidas (pH 1,0 e pH 2,0) e em iogurte. No entanto, a microencapsulação em

acetatoftalato de celulose foi efetiva na proteção desses microrganismos em soluções ácidas, embora não tenha sido eficiente quando *B. lactis* microencapsulado foi inoculado em iogurte.

Sun e Griffiths (2000) imobilizaram bifidobactérias em cápsulas com gomas gelana e xantana. As partículas (0,75% gelana e 1% xantana) apresentaram diâmetro de 3 µm. A sobrevivência de *B. infantis* ATCC 15697 foi avaliada em água peptonada, tampão pH 4, iogurte pasteurizado e suco gástrico simulado. Em água peptonada e tampão pH 4, a redução na contagem de células imobilizadas não foi significativamente diferente da contagem de células livres durante 6 semanas de estocagem a 4°C. Entretanto, contagens das populações de *B. infantis* imobilizadas foram significativamente superiores às de células livres em suco gástrico simulado com pH 1,5, 2,0 e 2,5. Em pH 2,5, a contagem de células livres decresceu de aproximadamente 9 log UFC/ml a um nível indetectável (<10 UFC/ml) em 30 min, enquanto para células imobilizadas houve um decréscimo de apenas 0,67 ciclos logarítmicos no mesmo período. Células imobilizadas também sobreviveram significativamente melhor em iogurte pasteurizado do que células livres.

O'Riordan *et al.* (2001) encapsularam células de *Bifidobacterium* PL1 em amido modificado utilizando um processo de secagem em *spray dryer*. Os autores concluíram que o processo de encapsulação utilizado não foi eficiente para preservar a viabilidade celular.

Guerin *et al.* (2003) encapsularam bifidobactérias em um gel composto de alginato, pectina e proteínas do soro. Após 1h em solução ácida (pH 2,5) com pepsina (10U/mL), as contagens de células livres decresceram 4,75 ciclos logarítmicos, enquanto para células encapsuladas houve uma redução inferior a 1 log. As células livres não sobreviveram após 2h de incubação em pH 2,5, enquanto para células imobilizadas houve um decréscimo de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos na população. Os autores concluíram que a encapsulação é um método eficiente para proteger células em solução ácida (pH 2,5) com pepsina (10U/mL). Entretanto, após incubação (1 a 3h) em soluções com sais biliares (2 e 4%), a mortalidade de bifidobactérias foi superior para células encapsuladas (4 a 7 log) em comparação com células livres (2 a 3 log).

Adhikari *et al.* (2003) adicionaram células vivas de *Bifidobacterium longum* microencapsuladas em κ -caragena em iogurte após o processo de fermentação e estocaram o produto a 4,4°C por 30 dias. Os resultados do estudo mostraram que não houve declínio no número de bactérias encapsuladas, porém a redução no número de células livres foi significativa no iogurte (89,3% para *B. longum* B6 e 91,8% para *B. longum* ATCC 15708), portanto, a microencapsulação protegeu as bifidobactérias do baixo pH do produto, aumentando a sua viabilidade durante o período de estocagem. A análise sensorial do produto revelou que a presença de micropartículas, com $235,8 \pm 25,6\mu\text{m}$, causou uma alteração na textura do produto, perceptível durante o consumo.

Lian *et al.* (2003) encapsularam *Bifidobacterium longum* B6 e *Bifidobacterium infantis* CCRC 14633 com gelatina, amido solúvel, leite desnatado e goma arábica utilizando *spray dryer*. A sobrevivência das células encapsuladas e livres foi investigada em suco gástrico simulado (pH 2,0 e 3,0) e em solução de bile (0,5% e 2,0%). A população de culturas microencapsuladas manteve-se mais estável que a população de células livres durante exposição a suco gástrico simulado e soluções de bile. Este fenômeno foi mais aparente em pH 2,0 e 2% de bile, entretanto, este efeito pode variar dependendo da cepa utilizada e do material de recobrimento.

Iyer e Kailasapathy (2005) estudaram os efeitos da microencapsulação com Hi-maize (um amido modificado), quitosana e alginato sobre a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* CSCC2400 e CSCC2409 em soluções ácidas (pH 2,0), com sais de bile e iogurte. A adição de Hi-maize (1%p/v) nas partículas com *Lactobacillus* spp. e posterior recobrimento com quitosana aumentaram significativamente a sobrevivência de bactérias encapsuladas em soluções ácidas (pH 2,0), com sais de bile e também em iogurte estocado por 6 semanas, em comparação com células encapsuladas em alginato.

Hansen *et al.* (2002) avaliaram a tolerância de nove espécies de bifidobactérias a condições simuladas do trato gastrintestinal a 37°C. A resistência ao suco gástrico simulado e bile variou entre as espécies testadas. *Bifidobacterium lactis* Bb-12 foi significativamente mais resistente ao baixo pH e bile do que as outras espécies testadas. Em suco gástrico simulado com pH 1,0, a

população inicial de aproximadamente 10^6 - 10^8 UFC/ml para todas as espécies testadas decresceu para menos de 10 UFC/ml (limite de detecção do teste) após 30 min de contato. Após 2 horas em pH 2,0, a população de *B. lactis* Bb12 decresceu de 9,5 log UFC/ml para 8,2 log UFC/ml. As cepas menos resistentes foram *B. bifidum* Bb-11 e *B. infantis* Bb-02, cujas populações decresceram a menos que 10UFC/ml após exposição em pH 2,0. A microencapsulação em alginato de cálcio não melhorou significativamente a sobrevivência de bifidobactérias em condições simuladas do trato gastrointestinal com pH 2,0 e 3,0.

Pelos estudos citados, pode-se notar que o alginato de cálcio tem sido amplamente utilizado para a imobilização de bactérias lácticas, principalmente devido a facilidade de manuseio, baixo custo e sua natureza não tóxica. Entretanto, sua efetividade quanto ao aumento da proteção de células expostas à ação do suco gástrico isolado ou em combinação com outras substâncias ainda deve ser estudada com o intuito de se estabelecer melhores condições de microencapsulação.

2 Objetivos

Este trabalho teve como objetivos:

- 1) Estudar a viabilidade tecnológica da microencapsulação de *Bifidobacterium lactis* em alginato e alginato-quitosana;
- 2) Verificar a viabilidade tecnológica da aplicação de dois polímeros com funcionalidade entérica (sureteric e acryl-eze), nas formulações das partículas de alginato-quitosana, com o intuito de promover liberação controlada de *Bifidobacterium lactis* em fluidos intestinais simulados;
- 3) avaliar a liberação e sobrevivência desta bactéria microencapsulada quando exposta a pH 4.5, 6,0 e 7.5, em soluções tampão que simulam as condições do trato gastrointestinal (pH 1.5, 5.6 e 7.5) e em leites fermentados;
- 4) Verificar se a presença de enzimas do trato gastrointestinal (pepsina e pancreatina) capazes de hidrolizar nutrientes do leite influenciam a taxa de sobrevivência de *B. lactis* encapsulado ou não em testes de simulação da passagem desta bactéria pelos sucos gástrico e entérico;
- 5) e avaliar o efeito da microencapsulação na sobrevivência de *B. lactis* em leite fermentado submetido a condições simuladas do trato gastrointestinal.

3 Materiais e Métodos

3.1 Reagentes

Os reagentes utilizados para o processo de microencapsulação foram: quitosana (baixo peso molecular, grau de deacetilação de 75-85%, Aldrich Chemical Company, Inc.), alginato de sódio (Degussa Texturant Systems), sureteric (Blanver Farmoquímica Ltda.), acryl-eze (Colorcon do Brasil Ltda.) e cloreto de cálcio dihidratado (Anidrol Produtos Químicos Ltda.). Para os testes de simulação de fluidos do trato gastrintestinal utilizou-se: pancreatina (Sigma Chemical CO), amano lipase F-AP15 (Aldrich Chemical Company, Inc.), pepsina (Sigma Chemical CO) e bile (Ox Gall Powder, Sigma Chemical CO).

3.2 Culturas microbianas

Como cultura probiótica, foi utilizada uma cepa liofilizada de *Bifidobacterium lactis* (Bb12) tipo DVS (*Direct Vat Set*) da Christian Hansen Ind. e Com. Ltda. (Valinhos, SP).

3.3 Métodos microbiológicos

3.3.1 Seleção de meio de cultura para cultivo de *B. lactis*

Com o objetivo de identificar o melhor meio de cultura para a reativação e cultivo de *B. lactis* a 37°C por 20 horas, as seguintes formulações (Lima, 2005) foram testadas:

- a) Caldo MRS com 0,1% de cloreto de lítio e 0,3% de propionato de sódio
- b) Leite integral tipo UHT com 2% de glicose e 1% de extrato de levedura
- c) Leite integral tipo UHT com 2% de glicose, 1% de extrato de levedura e 0,05% de cisteína-HCl
- d) Leite desnatado reconstituído com 2% de glicose, 1% de extrato de levedura e 0,05% de cisteína-HCl
- e) Leite desnatado reconstituído com 1% de glicose, 1% de extrato de levedura e 0,05% de cisteína-HCl

3.3.2 Preparo do inóculo de *B. lactis* para a encapsulação

Os inóculos utilizados nos processos de encapsulação foram preparados através do cultivo do microrganismo (0,15%) em leite desnatado reconstituído suplementado com extrato de levedura (1%), glicose (1%) e L-cisteína (0,05%) por 20 horas a 37°C. O caldo fermentado foi centrifugado a 2360Xg por 8 min e lavado com salina 0,85% por duas vezes. Então, as células foram suspensas em salina 0,85% para a obtenção de uma suspensão com aproximadamente 10^9 - 10^{10} UFC/ml.

A suspensão foi adicionada à solução de alginato de sódio de modo que se obtivesse uma concentração de aproximadamente 10^8 - 10^9 UFC/ml. A mistura resultante de alginato de sódio com *B. lactis* foi submetida ao processo de microencapsulação.

Com o objetivo de se preparar um controle de células livres para os testes de avaliação da liberação de células das partículas e sobrevivência em diferentes soluções tampão, parte do inóculo preparado foi armazenado em refrigeração sendo ressuspenso em salina ou desidratado. Para a desidratação, após processo de lavagem e centrifugação, as células foram espalhadas cuidadosamente em placas de petri estéreis e desidratadas em temperatura ambiente por 24 horas em câmara de fluxo laminar (mesmo procedimento aplicado às células encapsuladas). Esse procedimento visou a obtenção de um controle de células com tratamento similar ao do processo de encapsulação, o qual causa um certo nível de injúria à célula.

3.3.3 Enumeração de *B. lactis*

As análises microbiológicas foram realizadas em ágar MRS (Oxoid) suplementado com cloreto de lítio (0,1%), propionato de sódio (0,3%) e L-cisteína (0,05%), com incubação a 37°C por 72 horas em anaerobiose (Anaerogen, Oxoid).

3.3.4 Avaliação de atividade antimicrobiana da quitosana

O teste de difusão em poços descrito por Harris *et al.* (1989), com modificações, foi usado para a verificação de possível efeito bactericida ou bacteriostático da quitosana sobre as células de *B. lactis*. Aproximadamente 20 ml de MRS fundido contendo 1% de ágar e 0,05% de cisteína-HCl foram inoculados com uma cultura fresca de *B. lactis* de forma a atingir uma concentração de 10^5 - 10^6 UFC/ml e transferidos para uma placa de petri estéril. Após a solidificação, foram perfurados poços com 3 a 4 mm de diâmetro. Em diferentes poços foram adicionadas soluções de quitosana 0,5%, 1% e 2,5%. As placas foram incubadas em anaerobiose por 72 h a 37°C e, após a multiplicação microbiana, observou-se a possível formação de halos ao redor dos poços.

3.4 Preparo de micropartículas por atomização e gelificação

Para a realização da microencapsulação, foram utilizadas as instalações e equipamentos do Laboratório de Tecnologia de Partículas do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), de acordo com a metodologia estabelecida por Zimmermann (2001), com modificações.

Utilizou-se o método de atomização e geleificação, sendo o processo realizado em um reator de 4 litros, encamisado, onde as soluções foram adicionadas e agitadas (175rpm) com o auxílio de um agitador mecânico a 20°C. A atomização foi realizada utilizando-se um bico de duplo fluido, de mistura externa, com diâmetro de 1mm (dispositivo acessório de um *spray dryer* Büchi 190). O ar de atomização foi mantido a um fluxo de 600NI/h. A vazão de alimentação foi regulada em 6,7 mL/min, aproximadamente. A distância entre o bico de atomização e a superfície da solução gelificante no reator foi fixada em 18cm, e o tempo de cura estabelecido foi de 30 minutos com agitação.

Para o processo de encapsulação foram utilizados os polímeros alginato de sódio (Degussa Texturant Systems), quitosana (baixo PM, Aldrich Chemical Company, Inc.), sureteric (Blanver Farmoquímica Ltda.) e acryl-eze (Colorcon do Brasil Ltda.). Também utilizou-se como reagente o cloreto de cálcio dihidratado (Anidrol Produtos Químicos Ltda.).

Os procedimentos de encapsulação testados estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Identificação e descrição dos ensaios de microencapsulação por atomização realizados.

Procedimento de encapsulação *	Solução atomizada	1º Etapa	2º Etapa
1) Alginato	Alginato de sódio 2%	CaCl ₂ 0,1M	----
2) Alginato-quitosana	Alginato de sódio 2%	Solução de quitosana 0,5% em solução de HCl (pH 4,0) com CaCl ₂ 0,1M	----
3) Alginato-quitosana 2 etapas	Alginato de sódio 2%	CaCl ₂ 0,1M	Sol. de quitosana 0,5% em solução HCl (pH 4,0)
4) Alginato-quitosana-sureteric 1%	Alginato de sódio 2% com sureteric 1%	Solução de quitosana 0,5% em solução de HCl (pH 4,0) com CaCl ₂ 0,1M	----
5) Alginato-quitosana-sureteric	Alginato de sódio 2% com sureteric 0,1%	Solução de quitosana 0,5% em solução de HCl (pH 4,0) com CaCl ₂ 0,1M	----
6) Alginato-quitosana-acryl-eze	Alginato de sódio 2% com acryl-eze 0,1%	Solução de quitosana 0,5% em solução HCl (pH 4,0) com CaCl ₂ 0,1M	----

* Nesta coluna encontra-se a nomenclatura estabelecida para os vários processos de microencapsulação e utilizada na discussão dos resultados.

A solução de alginato de sódio foi atomizada nas soluções descritas de acordo com a primeira etapa da Tabela 2, utilizando-se um bico de duplo fluido. Nos processos que envolveram 2 etapas, as partículas de alginato foram filtradas, lavadas com água Milli Q, e ressuspensas no mesmo reator em solução de quitosana 0,5%. As micropartículas formadas foram mantidas sob agitação por 30 min após o final dos processos listados na Tabela 2.

De acordo com a Tabela 2, o procedimento 1 consiste na atomização da solução de alginato diretamente na solução de cloreto de cálcio 0,1M, sem posterior adição de quitosana.

Os procedimentos 2, 4, 5 e 6, desenvolvidos em uma única etapa, foram realizados através da atomização da solução de alginato de sódio, com ou sem sureteric ou acryl-eze, diretamente em uma solução de quitosana 0,5%, contendo CaCl_2 0,1M. A quitosana foi dissolvida em solução de HCl com pH 4,0.

O procedimento 3 foi desenvolvido em duas etapas. Na primeira etapa, fez-se a atomização da solução de alginato de sódio em uma solução de CaCl_2 0,1 M e, na segunda etapa, micropartículas formadas foram recobertas com quitosana, adicionando-se uma solução de quitosana 0,5% dissolvida em solução de HCl (pH4,0).

As micropartículas geleificadas foram filtradas a vácuo, lavadas com água por duas vezes e espalhadas cuidadosamente em uma placa de Petri para secagem à temperatura ambiente por 24 horas. Depois de secas, as micropartículas foram mantidas em dessecador para serem posteriormente caracterizadas e submetidas a testes de estabilidade. As partículas com *B. lactis* foram armazenadas em ambiente refrigerado.

3.5 Caracterização das micropartículas

3.5.1 Microscopia óptica

As fotomicrografias foram obtidas com um microscópio óptico modelo Eclipse E 400POL, munido de uma câmara fotográfica NIKON. Foram observadas partículas desidratadas, retiradas na etapa final do processo de encapsulação, acondicionadas em solução de CaCl_2 0,07M e/ou submetidas a tratamento com tampão pH 7,5 com aumento de 40, 100 e/ou 200 vezes.

3.5.2 Análise granulométrica

O diâmetro médio das micropartículas obtidas por atomização e geleificação foi determinado por difração de raio “laser”, utilizando-se analisador MASTERSIZER 2000 (Malvern Instruments). Através deste equipamento, determinou-se também os valores do diâmetro da partícula correspondente a 10% da distribuição acumulada, e do diâmetro da partícula correspondente a 90% da distribuição acumulada.

3.5.3 Determinação da concentração de cálcio

A concentração de cálcio nas soluções resultantes dos processos de atomização foi determinada por potenciometria, com o uso de um eletrodo tipo 15 220 3000 INGOLD (Mettler Toledo). Para a determinação da concentração de cálcio foi preparada uma curva padrão com cloreto de cálcio para a calibração do equipamento.

3.6 Avaliação da estabilidade das micropartículas e da liberação de *Bifidobacterium lactis* em tampão fosfato

Para a avaliação do efeito do pH sobre a liberação de células das partículas, foram utilizadas soluções tampões ajustadas em pH 4,5, 6,0 e 7,5 em testes de dissolução com partículas obtidas pelos processos 1, 2, 4, 5 e 6 (conforme Tabela 2). As partículas foram adicionadas na proporção de 0,001g/ml e as soluções resultantes foram submetidas à agitação de 150 rpm (Innova 4000, New Brunswick Scientific), 37°C, sendo alíquotas retiradas após 5, 30 e 60 minutos para determinação da população de *Bifidobacterium lactis* liberada das micropartículas. A população bacteriana liberada foi enumerada através da técnica de semeadura em profundidade, conforme descrito no item 3.3.3. Sempre que necessário foram efetuadas diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% antes da enumeração por semeadura em profundidade.

A integridade das partículas submetidas a pH 7,5 foi monitorada por microscopia óptica. Partículas desidratadas foram adicionadas em tampão fosfato pH 7,5 em uma lâmina onde foi feita a observação do intumescimento e liberação de células das partículas, utilizando-se um microscópio óptico modelo Eclipse E 400POL, munido de uma câmara fotográfica NIKON. As fotomicrografias foram tiradas em intervalos de tempo regulares que demonstrassem as alterações sofridas pelas partículas.

3.7 Avaliação da liberação e sobrevivência de *B. lactis* em teste de simulação de fluidos gastrintestinais sem a adição de enzimas

A sobrevivência e liberação de células das micropartículas em função do pH foram avaliadas através da simulação de fluidos do trato gastrintestinal sem a adição de enzimas, de acordo com procedimento proposto por Sallans *et al.* (1988) com modificações. As partículas foram adicionadas em tampão pH 1,5 e incubadas a 37°C por 120 min com agitação de 150 rpm (Innova 4000, New Brunswick Scientific). Em seguida, o pH do meio foi alterado para 5,6 por mais 120

minutos e, finalmente, alterado para pH 7,5 pelos últimos 120 minutos, totalizando 6 horas de ensaio. A amostragem foi realizada em intervalos pré-definidos de tempo em pH 1,5, 5,6 e 7,5. A sobrevivência de células livres também foi determinada, como uma referência, utilizando-se o mesmo inóculo do processo de microencapsulação acondicionado em salina 0,85% e também como células desidratadas. Também foi realizado um controle com células liofilizadas.

Para esse experimento foram preparadas duas soluções tampão com pH 12,0 e 1,5, empregando-se soluções de HCl 1N, NaOH 1N, e os sais NaCl e $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. A mistura desses tampões na proporção adequada resultou nos valores de pH 5,6 e 7,5.

3.8 Avaliação da sobrevivência de *Bifidobacterium lactis* microencapsulado após ação de suco gástrico e entérico formulados com pepsina, pancreatina e bile

A sobrevivência e liberação de células das micropartículas foram avaliadas em sucos gástrico e entérico simulados, utilizando-se enzimas do trato gastrintestinal (Gänzle *et al.*, 1999, com alterações).

As partículas foram adicionadas ao tampão pH 1,5, contendo pepsina (3g/L) e lipase (0,9mg/L), e incubadas a 37°C por 120 min com agitação de 150 rpm (Innova 4000, New Brunswick Scientific). Em seguida, o pH foi alterado para 5,6 por mais 120 minutos e, finalmente, alterado para pH 7,5 pelos últimos 120 minutos. Nas etapas de simulação dos fluidos entéricos, adicionou-se pancreatina (1g/L) e bile (10g/L) simultaneamente. O experimento totalizou 6 horas de ensaio, sendo a amostragem realizada em intervalos pré-definidos de tempo em pH 1,5, 5,6 e 7,5. A sobrevivência de células livres também foi determinada, como uma referência, utilizando-se o mesmo inóculo do processo de microencapsulação, acondicionado em salina 0,85% e também como células desidratadas, e células liofilizadas tipo DVS (*Direct Vat Set*).

3.9 Sobrevivência de células de *Bifidobacterium lactis* livres e microencapsuladas em leite fermentado

3.9.1 Preparo do leite fermentado

O leite fermentado foi preparado com leite UHT integral, sendo a fermentação realizada com a cultura Rich (Christian Hansen), composta por uma mistura de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. A incubação foi realizada a 42°C por aproximadamente 5 horas, de acordo com as instruções do rótulo do produto. Ao leite fermentado pronto foram adicionadas culturas de *Bifidobacterium lactis* submetidas a quatro tratamentos diferentes: desidratação em temperatura ambiente, liofilização/congelamento (Bb12, Christian Hansen), encapsulação em alginato-quitosana e encapsulação em alginato-quitosana-acryl-eze. Após a homogeneização, o produto foi acondicionado em tubos Falcon (50ml) que foram armazenados a 8°C durante 4 semanas. A população sobrevivente de *B. lactis* foi determinada semanalmente no leite fermentado e também após tratamento simulando condições do trato gastrintestinal com presença e ausência de enzimas gástricas. Em cada amostragem semanal utilizou-se um tubo Falcon para cada tratamento. Foram realizadas três repetições do preparo dos iogurtes.

3.9.2 Avaliação da população de *Bifidobacterium lactis*, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* em leite fermentado

As populações de *Bifidobacterium lactis*, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* em leite fermentado foram determinadas após 0, 1, 2, 3 e 4 semanas.

As micropartículas foram previamente submetidas a tratamento em tampão fosfato pH 7,5 por 120 min para liberação das células encapsuladas, através da solubilização de 1 mL de leite fermentado em 9 mL de tampão. Outras diluições decimais foram efetuadas em água peptonada 0,1%.

A contagem das bactérias foi realizada de acordo com a metodologia estabelecida por Adhikari *et al.* (2000) com modificações. *Bifidobacterium* sp. foi enumerado em ágar MRS (Oxoid) contendo cloreto de lítio (0,4%), propionato de sódio (0,6%) e L-cisteína (0,05%) pela técnica de semeadura em profundidade e incubação a 37°C por 72 horas em anaerobiose (Anaerogen, Oxoid). *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* foram enumerados em ágar ST e ágar M17 (Oxoid) e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* foram enumerados em ágar MRS pH 5,4 com sobrecamada. A incubação foi realizada em aerobiose, a 37°C para *S. thermophilus* e a 42°C para *L. bulgaricus* por 72 horas.

3.9.3 Avaliação da sobrevivência de *B. lactis* em leite fermentado após passagem por teste de simulação de fluidos gastrintestinais com e sem a adição de enzimas

Uma alíquota de cada leite fermentado produzido (1mL) foi misturada com tampão pH 1,5, contendo pepsina (3g/L) e lipase (0,9mg/L), e incubada a 37°C por 120 min com agitação de 150 rpm (Innova 4000, New Brunswick Scientific). Em seguida, o pH foi alterado para 5,6 por mais 120 minutos e, finalmente, alterado para pH 7,5 pelos últimos 120 minutos. Nas etapas de simulação dos fluidos entéricos, pancreatina (1g/L) e bile (10g/L) foram adicionados simultaneamente. Cada experimento totalizou 6 horas de ensaio, sendo a retirada de alíquotas realizada em intervalos pré-definidos de 30 e 120 min para pH 1,5 e 120 min para pH 5,6 e 7,5. O mesmo teste também foi realizado sem a adição das enzimas digestivas. Foram realizadas três repetições para cada tratamento.

3.9.4 Determinação do pH

O pH do iogurte foi determinado diretamente nas amostras com o auxílio de um aparelho medidor de pH da marca Digimed-Mod. DMPH-2.

3.10 Análise estatística

Para análise estatística, utilizou-se o “planejamento experimental em parcelas subdivididas” (Gomes, 1987), recomendável para casos em que se pretende estudar dois ou mais tipos diferentes de tratamentos. Utilizou-se o programa SAS 8.12 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA Copyright @ 1999-2001, Release 8.12, TS2MO) para a execução dos cálculos.

A interação “tratamento versus tempo” também foi desdobrada para a verificação do melhor tratamento dentro de cada tempo. Neste caso, utilizou-se para a comparação múltipla o teste de Tukey.

4 Resultados e Discussão

4.1 Reativação e cultivo da cultura de *Bifidobacterium lactis*

A reativação e o cultivo de *B. lactis* foram testados em vários meios de cultura. Notou-se que a adição de L-cisteína (0,05%) foi fundamental para a multiplicação de *B. lactis*, fato que se justifica pela natureza anaeróbica da bactéria. Dentre os meios testados, optou-se pelo uso de leite desnatado reconstituído com 1% de glicose, 1% de extrato de levedura e L-cisteína (0,05%) para o preparo do inóculo, pois se supõe que uma menor concentração de açúcar resulta em uma menor produção de ácidos, fato benéfico para a manutenção da viabilidade celular por um tempo mais prolongado. Os inóculos preparados para os processos de encapsulação apresentaram uma população de aproximadamente 9,5 log UFC/ml.

4.2 Avaliação de atividade antimicrobiana da quitosana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana da quitosana, foi utilizado o teste de difusão em poços (Harris *et al.*, 1989) e observada a formação de halos no meio de cultura. Como não houve a presença de halos de inibição da multiplicação do microrganismo ao redor dos poços, conclui-se que a quitosana não apresentou atividade antimicrobiana contra *B. lactis* nas concentrações testadas de 0,5%, 1,0% e 2,5%.

4.3 Caracterização de micropartículas obtidas por atomização e geleificação

4.3.1 Resultados obtidos com a microscopia óptica, análise de tamanho de partícula e análise da concentração de cálcio

Micropartículas com *Bifidobacterium lactis* foram obtidas pelos processos de atomização com alginato, alginato-quitosana 1 etapa, alginato-quitosana 2 etapas, alginato-quitosana-sureteric 1%, alginato-quitosana-sureteric 0,1% e alginato-quitosana-acryl-eze 0,1% (Tabela 2).

De acordo com a microscopia óptica, verificou-se que as partículas produzidas somente com alginato solubilizaram-se totalmente em solução de tampão fosfato pH 7,5 (Figura 2). Por outro lado, partículas produzidas com alginato e quitosana não se solubilizaram completamente quando adicionadas a essa solução por até 60 min (Figuras 3, 4, 5, 6 e 7). Supõe-se que a porosidade das partículas seja um parâmetro fundamental para aumentar ou diminuir a liberação do material encapsulado, e essa porosidade pode variar em função do meio de dissolução e de seu efeito na solubilidade do encapsulante. O alginato é solúvel em pH alcalino, enquanto a quitosana é solúvel em pH ácido, porém com a interação entre esses dois polímeros e o cloreto de cálcio como agente de "cross-linking", forma-se uma matriz complexa, cuja solubilidade pode variar de acordo com as variáveis do processo (concentração dos reagentes, tipo de quitosana, tipo de alginato, interação com outros polímeros, tempo de reação, etc.).

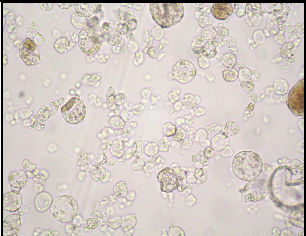
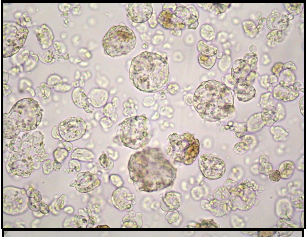
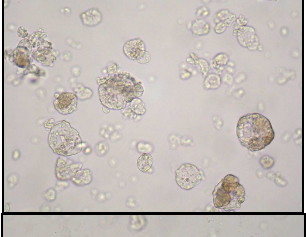
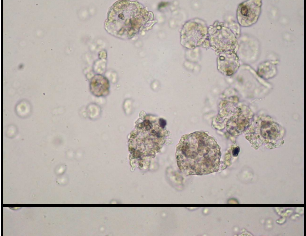


Também é importante ressaltar que os polímeros entéricos sureteric e acryl eze foram adicionados à formulação das partículas com o intuito de aumentar a porosidade do material de recobrimento e, conseqüentemente, aumentar a liberação de células em pH 7,5, mas não em pH ácido. Como não havia referências na literatura sobre a aplicação desses polímeros como aditivo em partículas de alginato-quitosana, foram feitos testes com porcentagens de 0,1% e 1% de sureteric e de 0,1% de acryl eze. Pelas fotomicrografias obtidas com a

formulações alginato-quitosana-sureteric 0,1% e alginato-quitosana-acryl-eze 0,1% (Figuras 6 e 7), pode-se observar que mesmo após 60 minutos de exposição em pH 7,5 as partículas mantiveram uma estrutura bem definida, porém com uma certa porosidade caracterizada pelo acúmulo de células liberadas e dispersas ao redor das partículas. A formulação com alginato-quitosana-sureteric 1% resultou em partículas que se aglomeraram de forma excessiva e não apresentaram estabilidade em pH 7,5 (Figura 5).

O diâmetro médio das partículas, como pode ser observado na Tabela 3, variou de 57,5 a 111,9 μm , dentro de uma faixa granulométrica de 11,0 a 266,9 μm . Como mostram esses resultados, as micropartículas produzidas com quitosana possuem diâmetro médio maior que as partículas de alginato, com exceção das partículas com 1% de sureteric. A determinação do diâmetro médio e as fotomicrografias mostradas na Tabela 3 foram feitas antes da etapa de secagem, quando as partículas tendem a se aglomerar, dificultando a medida do tamanho médio das microesferas.

A concentração de cálcio nas soluções utilizadas nos processos de encapsulação variou de 4007 mg/L (solução 0,1M de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 2980 mg/L (solução 0,07M de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), após o processo de atomização, o que significa que parte do cálcio adicionado reagiu com o alginato, ou com o complexo alginato-quitosana, participando do processo de formação das partículas.

Tabela 3. Diâmetro médio das partículas obtidas por diferentes procedimentos de encapsulação.

Processo de encapsulação	Fotomicrografias (200X)	D(4,3)* µm	D(0,1)** µm	D(0,9)*** µm	Span****
1) Alginato		57,5	116	131,6	3,9
2) Alginato- quitosana		103,3	14,1	266,9	4,7
3) Alginato- quitosana 2 etapas		82,5	11,2	200,7	4,1
4) Alginato- quitosana- sureteric 1,0%		58,2	11,0	110,8	2,4
5) Alginato- quitosana- sureteric 0,1%		108,0	19,2	228,0	2,4
6) Alginato- quitosana- acryl-eze 0,1%		111,9	19,2	218,3	2,4

* D(4,3) = diâmetro médio das partículas em volume.

** D(0,1) = diâmetro da partícula correspondente a 10% da distribuição acumulada.

*** D(0,9) = diâmetro da partícula correspondente a 90% da distribuição acumulada.

**** Span = medida indireta da dispersão ou da largura da distribuição granulométrica. Igual a $[d(0,9)-d(0,1)]/d(0,5)$.

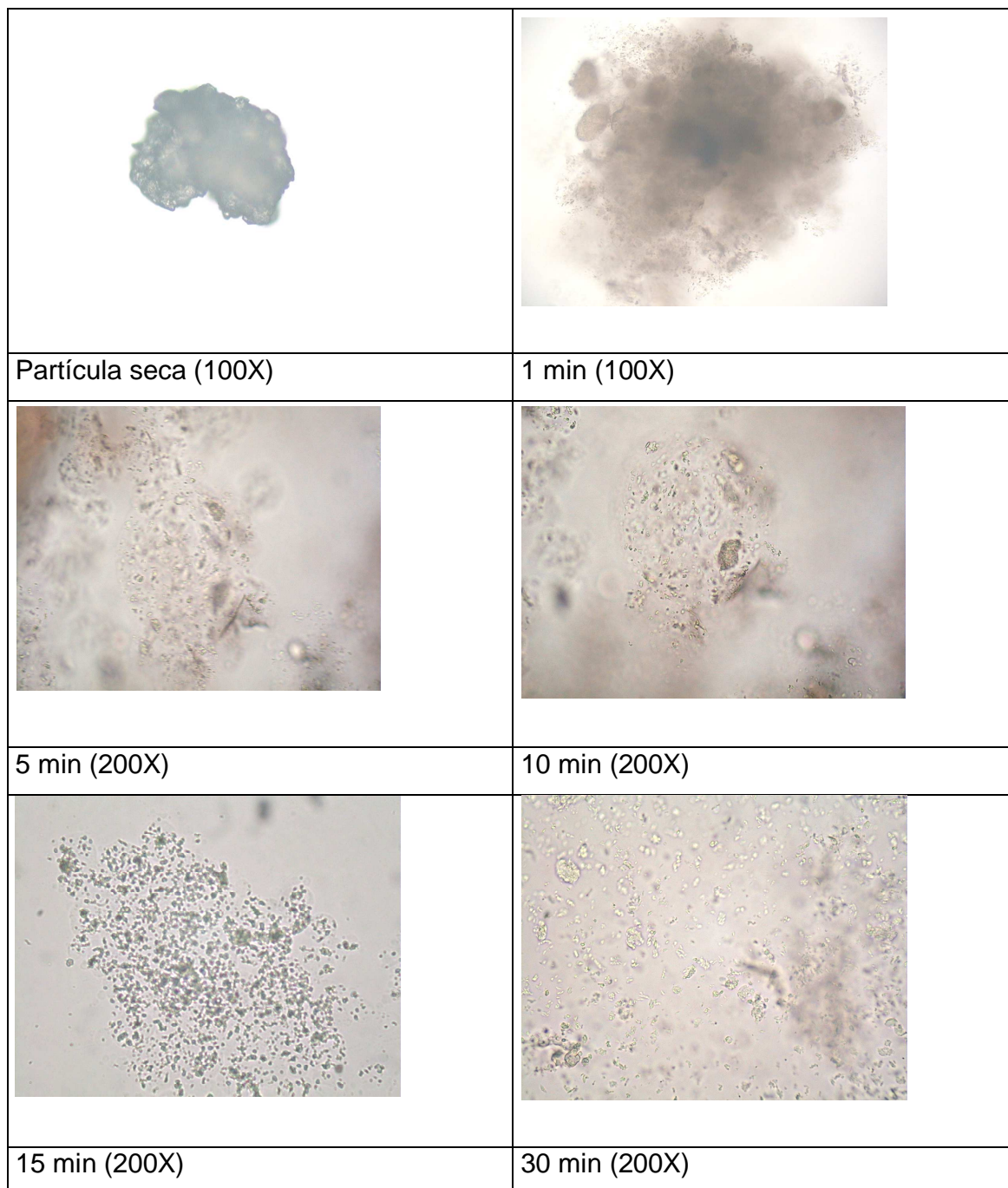


Figura 2. Fotomicrografias das partículas de alginato secas e após 1, 5, 10, 15 e 30 min em tampão fosfato pH 7,5.

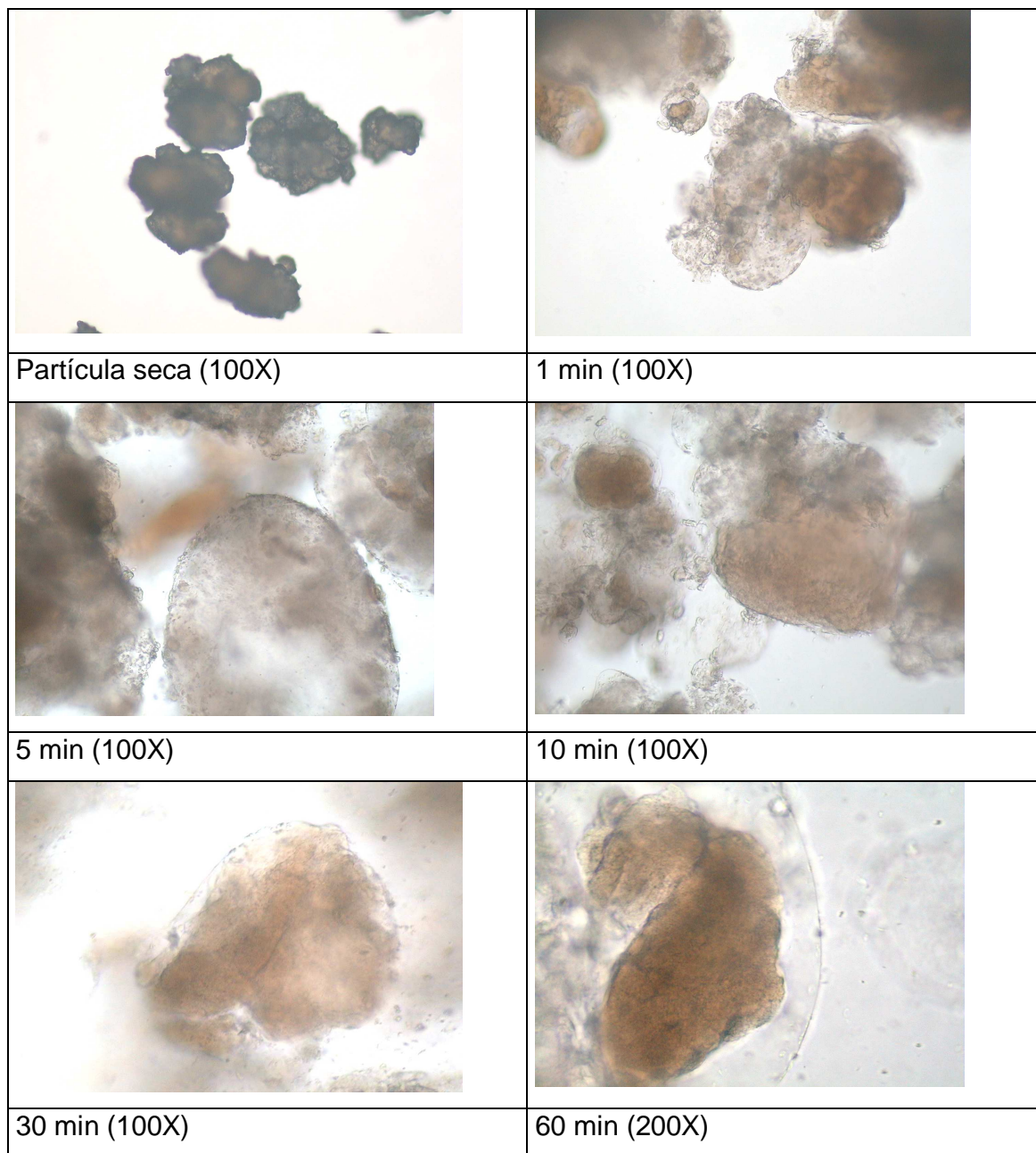


Figura 3. Fotomicrografias de partículas de alginato-quitosana secas e após 1, 5, 10, 30 e 60 min em tampão fosfato pH 7,5.

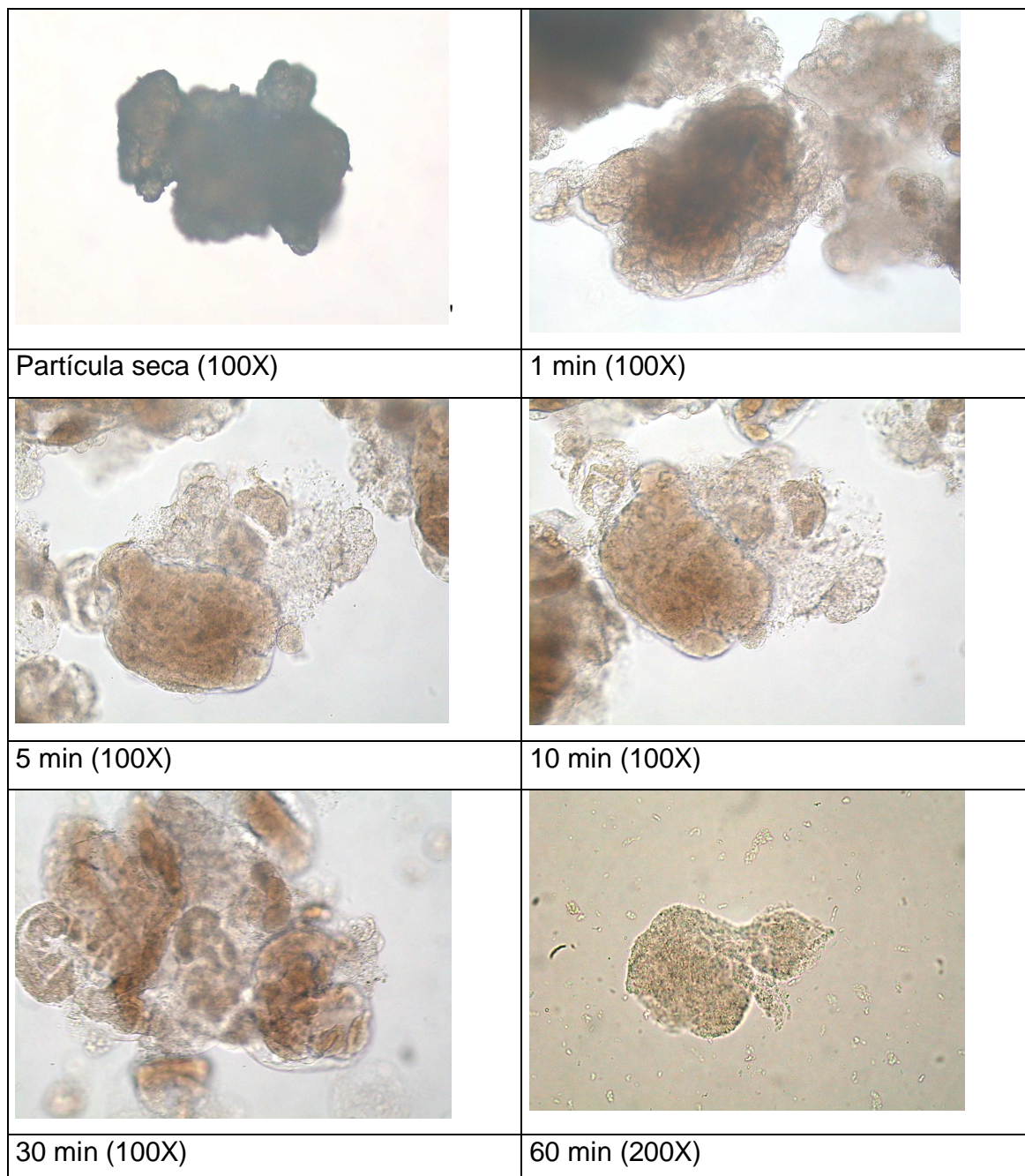


Figura 4. Fotomicrografias de partículas do tipo alginato-quitosana 2 etapas secas e após 1, 5, 10, 30 e 60 min em tampão fosfato pH 7,5.

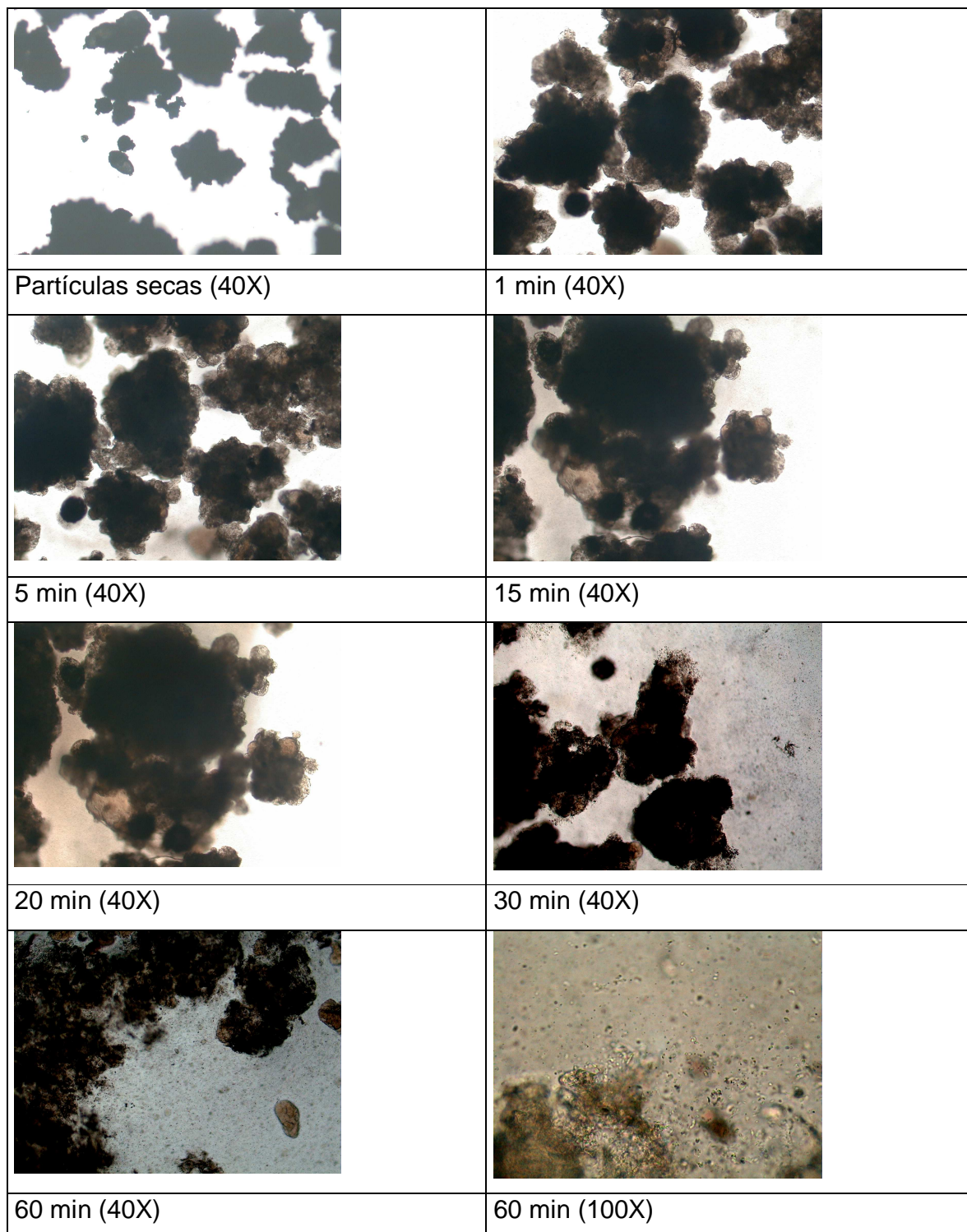


Figura 5. Fotomicrografias de partículas de alginato-quitosana-sureteric 1% secas e após 1, 5, 15, 20, 30 e 60 min em tampão fosfato pH 7,5.

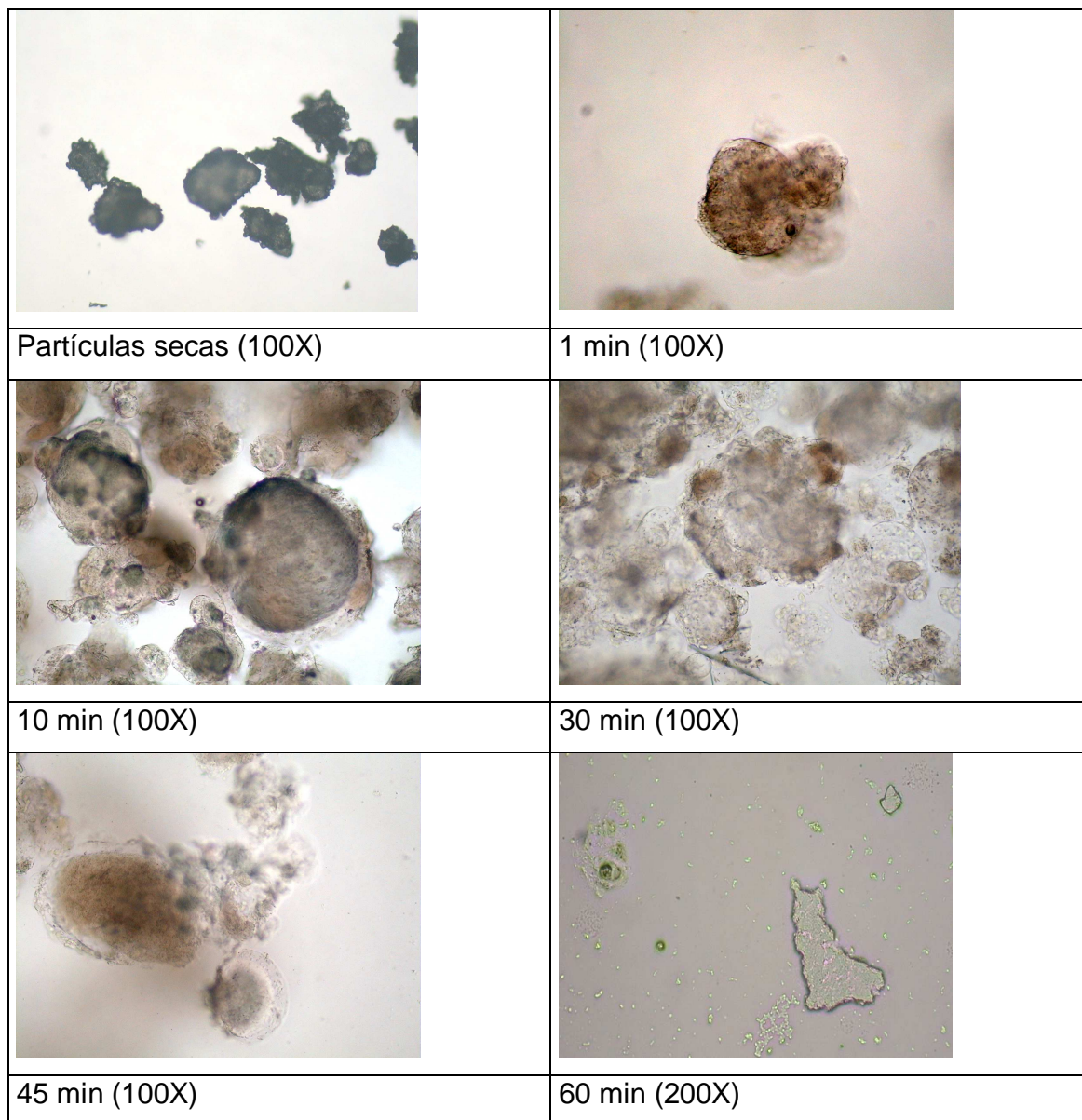


Figura 6. Fotomicrografias de partículas de alginato-quitosana-sureteric 0,1% secas e após 1, 10, 30, 45 e 60 min em tampão fosfato pH 7,5.

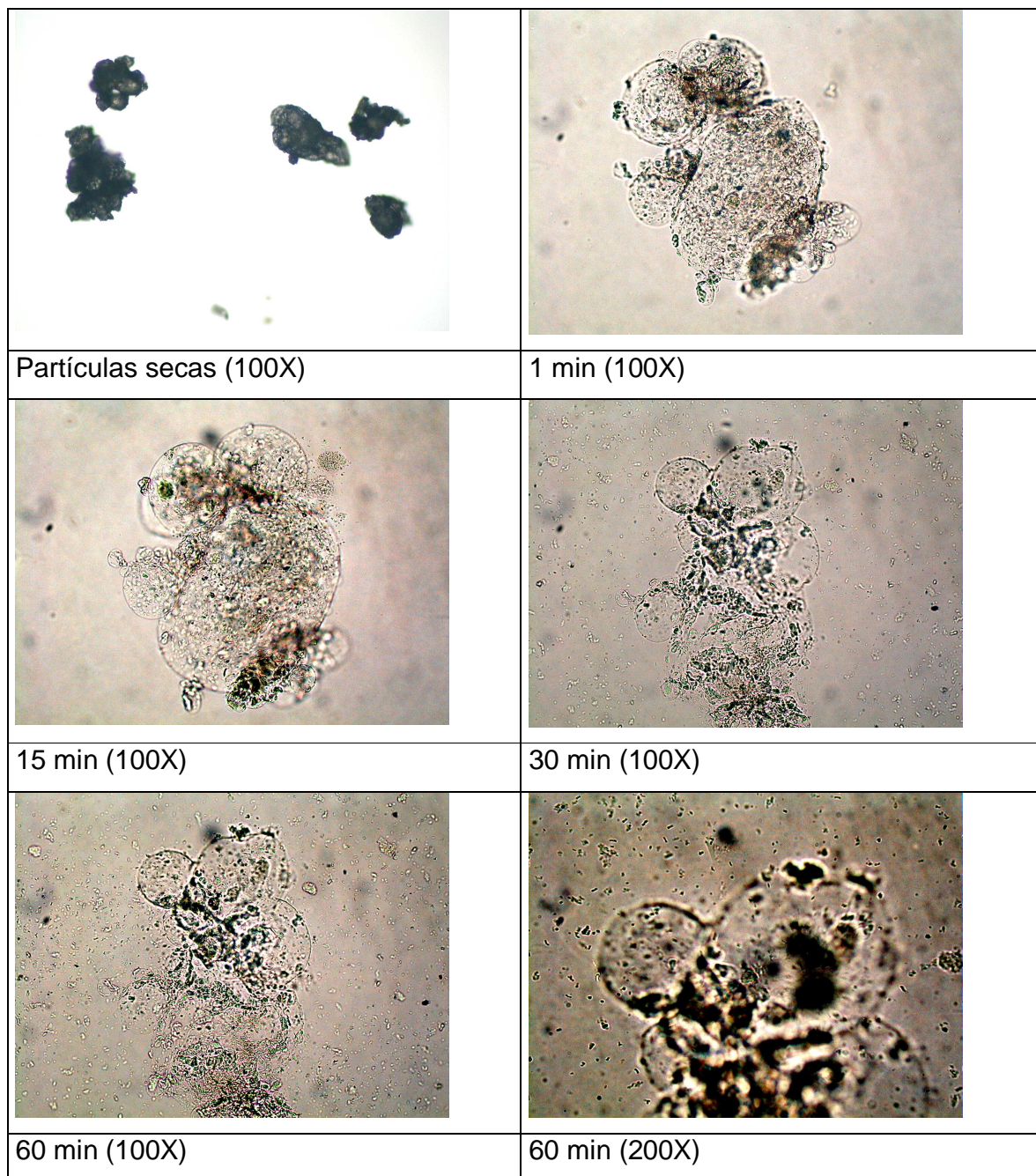


Figura 7. Fotomicrografias de partículas tipo alginato-quitosana-acryl-eze 0,1% secas e após 1, 15, 30 e 60 min em tampão fosfato pH 7,5.

4.4 Avaliação da liberação de *Bifidobacterium lactis* das micropartículas em soluções tampão

Após a obtenção de diferentes tipos de partículas, alginato, alginato-quitosana 1 etapa, alginato-quitosana 2 etapas, alginato-quitosana-sureteric 1%, alginato-quitosana-sureteric 0,1% e alginato-quitosana-acryl-eze 0,1%, iniciou-se um estudo para a escolha da formulação mais adequada para a manutenção da viabilidade das células de *B. lactis* e possível aplicação em leites fermentados. Esse estudo consistiu na avaliação da liberação de células das micropartículas em soluções tampão. Assim, com a realização dos primeiros ensaios em tampão, as formulações foram sendo descartadas ou escolhidas para a continuidade dos testes (resistência em fluidos gastrintestinais e aplicação em leites fermentados).

Essas formulações foram criadas com o intuito de se utilizar polímeros naturais e atóxicos, o alginato e a quitosana, e ao mesmo tempo polímeros que pudessem aumentar a porosidade da partícula especificamente nas condições do trato intestinal, ou seja, em meios com pH 7,5. Os polímeros escolhidos para aumentar a porosidade foram o acryl eze (polímero a base de ácido metacrílico copolímero tipo C) e o sureteric (polímero a base de polivinilacetatoftalato), que são polímeros com funcionalidade entérica, ou seja, insolúveis em valores de pH abaixo de 5,5 e 4,5, respectivamente, e totalmente solúveis em valores de pH acima de 6,0.

Para análise dos resultados, considerou-se que a liberação de *B. lactis* das partículas de alginato em tampão pH 7,5 foi máxima, o que significa que a população do microrganismo nessas partículas pode ser considerada como um controle, correspondente à população efetivamente imobilizada nos processos testados. Essa afirmação pode ser comprovada com a análise das fotomicrografias obtidas após a dissolução das partículas de alginato em tampão pH7,5, uma vez que as partículas de alginato são completamente desintegradas (Figura 2).

As partículas tipo alginato-quitosana 2 etapas liberaram uma população de *B. lactis* 2,7 ciclos logarítmicos menor que as partículas de alginato em pH 7,5,

após 30 min de reação (dados não tabelados). Por este motivo essa formulação foi descartada para a continuidade dos testes, pois um dos objetivos da encapsulação é promover liberação controlada de células em pH 7,5. Esta diferença pode ter duas explicações: ou as partículas não liberaram 100% das células que foram imobilizadas devido à insolubilidade da sua formulação em pH 7,5, ou as células imobilizadas morreram durante ou após o processo de microencapsulação.

Por outro lado, partículas tipo alginato-quitosana-sureteric 1% liberaram uma população de *B. lactis* de 8,8 log UFC/g após 60 min em tampão com pH 4,5 e de 9,4 log UFC/g após o mesmo período em tampão com pH 6,0 (dados não tabelados). Por esse motivo, essas partículas também foram descartadas para a continuidade do teste, pois, como já foi citado, o objetivo da encapsulação é promover a máxima retenção possível de células em pH 4,5 e a máxima liberação em pH 7,5, e esses valores estão muito próximos da população total de células encapsuladas (aproximadamente 9,5 log UFC/g). Neste caso, a concentração aplicada de sureteric foi muito alta e, provavelmente, desestabilizou a estrutura da partícula.

Os resultados dos testes de dissolução das partículas de alginato, alginato-quitosana 1 etapa, alginato-quitosana-acryl-eze e alginato-quitosana-sureteric em soluções tampão pH 4,5, 6,0 e 7,5 estão relatados na Figura 8 e na Tabela 4.

Tabela 4. Populações de *Bifidobacterium lactis* (log UFC/g) em partículas tratadas com tampão fosfato pH 4,5, 6,0 e 7,5.

pH	Tempo de tratamento (min)	Procedimento de encapsulação			
		Alginato	Alginato quitosana	Alginato quitosana sureteric 0,1%	Alginato quitosana acryl eze 0,1%
4,5	5	8,5 ^{Aa}	7,3 ^{Ba}	7,1 ^{Ba}	8,1 ^{Aa}
	30	8,6 ^{Aac}	7,7 ^{BCab}	7,3 ^{BCae}	8,0 ^{ACa}
	60	8,3 ^{Aa}	7,4 ^{Aa}	7,4 ^{Aae}	7,9 ^{Aa}
6,0	5	8,5 ^{Aac}	7,0 ^{Ba}	6,8 ^{Ba}	8,2 ^{Aa}
	30	8,7 ^{Aac}	8,0 ^{Babc}	7,6 ^{Bab}	8,9 ^{Aab}
	60	9,8 ^{Ab}	8,8 ^{Bbcd}	8,2 ^{Bbce}	8,8 ^{Bab}
7,5	5	8,7 ^{Aac}	8,1 ^{Aabc}	8,4 ^{Ac}	8,2 ^{Aa}
	30	9,4 ^{Abc}	9,1 ^{Ade}	9,2 ^{AcD}	9,2 ^{Aab}
	60	9,8 ^{Ab}	9,5 ^{Ae}	9,6 ^{Ad}	9,6 ^{Ab}

Obs: Para cada linha, valores relacionados com letras maiúsculas iguais não são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) e para cada coluna, valores relacionados com letras minúsculas iguais não são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

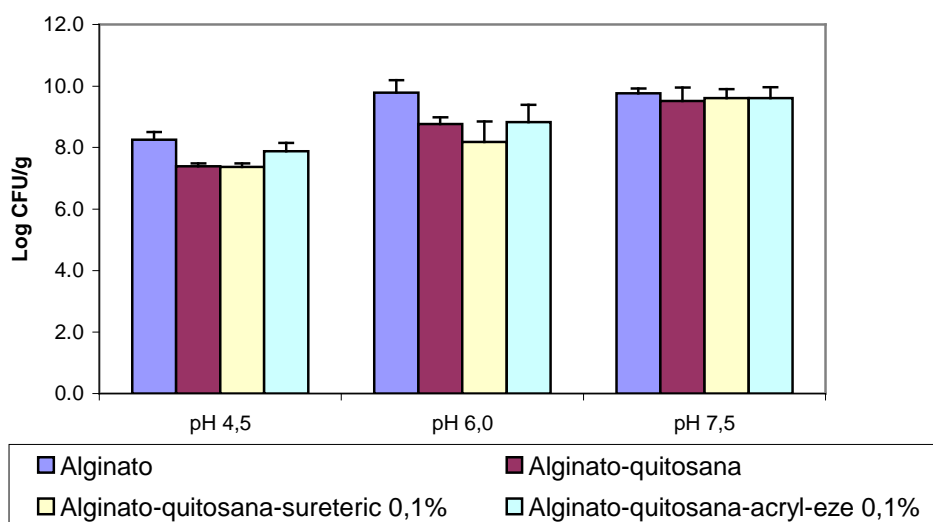


Figura 8. Populações de *B. lactis* (log UFC/g) liberadas de partículas de alginato, alginato-quitosana, alginato-quitosana-sureteric 0,1% e alginato-quitosana-acryl-eze 0,1% após 60 min a 37°C em soluções tampão pH 4,5, 6,0 e 7,5 a 37°C.

Pela Figura 8, pode-se notar que a liberação de células variou em função do pH, sendo a formulação com alginato a que menos reteve as células em pH 4,5 e 6,0. A alta taxa de liberação de células observada em pH 4,5 provavelmente deve-se à porosidade da partícula e erosão do gel. A Figura 8 indica ainda que a simples adição de quitosana, sureteric e acryl-eze, em concentrações adequadas, aumenta a retenção do material encapsulado em pH 4,5 e pH 6,0. Os resultados confirmaram que partículas com quitosana e polímeros entéricos (sureteric e acryl-eze) retêm os probióticos nas condições de pH ácido em comparação com as partículas tipo alginato, enquanto em pH 7,5 promovem a liberação das células encapsuladas devido à dissolução desses polímeros sensíveis a valores de pH superiores a 4,5.

Com a análise estatística, utilizando-se o método de Tukey para comparação múltipla, observou-se que não houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre as populações de células liberadas em pH 7,5, considerando-se as formulações alginato, alginato-quitosana, alginato-quitosana-sureteric 0,1% e alginato-quitosana-acryl-eze 0,1%. Por outro lado, houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre as populações de células liberadas em pH 4,5 das partículas tipo alginato-quitosana, alginato-quitosana-sureteric 0,1% e alginato-quitosana-acryl-eze 0,1%, em comparação com as liberadas em pH 7,5.

Como o objetivo do trabalho foi o desenvolvimento de partículas para uso em leites fermentados, buscava-se partículas que fossem insolúveis em pH 4,5 e que liberassem as células em pH 7,5, correspondente ao pH intestinal. Assim sendo, analisando a Figura 8, verifica-se que as formulações mais adequadas para atingir o objetivo do trabalho são aquelas que empregam alginato-quitosana e alginato-quitosana com sureteric 0,1% ou com acryl eze 0,1%. Essas formulações foram escolhidas para a realização de testes em fluidos gastrintestinais simulados com e sem a adição de enzimas. A formulação com alginato também continuou a ser utilizada como um controle.

4.5 Avaliação da liberação e sobrevivência de *B. lactis* em teste de simulação de fluidos gastrintestinais

Nos últimos anos, muitas pesquisas relacionadas com a sobrevivência de microrganismos em fluidos gastrintestinais têm sido realizadas em soluções tampão que simulam o pH fisiológico do estômago e do intestino, porém sem a utilização de enzimas digestivas, tais como pancreatina e pepsina. Entretanto, é importante a investigação sobre a alteração da taxa de sobrevivência de bactérias em decorrência da aplicação dessas enzimas, pois simulações com a adição de enzimas refletem de forma mais fiel a realidade. Além disso, na presença de nutrientes, como proteínas e lipídeos, a ação da enzima irá originar outras substâncias, como peptídeos, aminoácidos e ácidos graxos, que podem ou não exercer algum efeito protetor sobre células bacterianas. Neste trabalho, foi realizada a avaliação da liberação e sobrevivência de *B. lactis* em fluidos gastrintestinais formulados com e sem a adição de enzimas e os resultados foram diferentes do esperado, já que a pepsina apresentou um efeito protetor sobre as células de *B. lactis* (Itens 4.5.1 e 4.5.2.), e não inibidor como seria esperado.

As micropartículas utilizadas para este teste foram previamente desidratadas em temperatura ambiente para facilitar a manipulação, o armazenamento e evitar possíveis contaminações. Como controle de células livres, foram utilizadas células de *Bifidobacterium lactis* acondicionadas em salina 0,85%, liofilizadas e desidratadas em temperatura ambiente (mesmo processo de secagem aplicado nas micropartículas). Os três tipos de controle de células livres foram submetidos a diferentes níveis de injúria celular devido aos tratamentos previamente estabelecidos e, por isso, também apresentaram resultados distintos nos ensaios de simulação do trato gastrintestinal.

4.5.1 Avaliação da liberação e sobrevivência de *B. lactis* em teste de simulação de fluidos gastrintestinais sem a adição de enzimas

O fluxo gastrintestinal foi caracterizado com a utilização de soluções tampões pH 1,5, pH 5,6 e pH 7,5. As populações de células sobreviventes e/ou liberadas das micropartículas após os testes de simulação podem ser observadas na Tabela 5 e na Figura 9.

Pode-se notar que as populações de *B. lactis* foram reduzidas rapidamente em pH 1,5, chegando ao limite de detecção do teste (≤ 100 UFC/g) após 60 min, considerando-se todas as formulações e também as células não encapsuladas. Surpreendentemente, quando o pH foi aumentado de 1,5 para 5,6, e depois para 7,5, a população de células viáveis aumentou novamente mostrando que as células encapsuladas puderam sobreviver mesmo após terem sido expostas a um meio extremamente ácido por 120 min.

As células não encapsuladas, acondicionadas em salina 0,85% e na forma desidratada, foram adicionadas ao meio em uma concentração inicial de aproximadamente 10^9 UFC/ml e não foram mais recuperadas após os primeiros 60 minutos de ensaio. Isso significa que células livres e células presentes na superfície das partículas não resistem à incubação em meio ácido com pH 1,5 por mais de 60 min. Entretanto, células encapsuladas foram protegidas contra a acidez do meio, sofrendo um grau de injúria menor, e puderam sobreviver após dissolução ou erosão das micropartículas, quando o pH do meio foi alterado para pH 5,6 e 7,5.

A recuperação de células manteve-se na faixa de 3,83 a 5,07 log UFC/g em pH 5,6 e entre 5,21 e 6,02 log UFC/g em pH 7,5 após 120 min de ensaio, sendo sempre as maiores contagens obtidas com a formulação alginato-quitosana-acryl-eze e as menores com a formulação alginato-quitosana.

Durante o tratamento com a solução gástrica, as células encapsuladas sofreram uma redução mínima e máxima de 3,58 a 4,29 log UFC/g para as

formulações alginato-quitosana-acryl-eze e alginato-quitosana, respectivamente, em comparação com as contagens iniciais nas partículas.

A sobrevivência de células livres variou de acordo com o grau de injúria celular, pois células desidratadas ou liofilizadas não foram recuperadas após 15 minutos em tampão pH 1,5 (considerando o limite de detecção do teste de 100UFC/g), enquanto células acondicionadas em salina 0,85% foram recuperadas em até 30 min de teste com uma população de 3,07 log UFC/mL.

Cui *et al.* (2000) chegaram a resultados semelhantes encapsulando bífidobactérias em alginato por um método de atomização. A sobrevivência de bífidobactérias encapsuladas (8 logUFC/ml) foi superior à de células livres (3logUFC/ml) em simulação de suco gástrico (pH1,5 sem pepsina).

Favaro-Trindade e Grosso (2000, 2001, 2002), por outro lado, encapsularam *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* e concluíram que a imobilização em alginato de sódio não foi eficaz na proteção dessas bactérias em soluções ácidas (pH 1,0 e pH 2,0).

Esses resultados sugerem que a resistência de *Bifidobacterium lactis* à acidez pode ser aumentada através da encapsulação em diferentes tipos de micropartículas. Entretanto, fatores como a ação das enzimas digestivas, substâncias protetoras (proteínas do leite) e o grau de injúria das células também devem ser avaliados.

Tabela 5. População de *B. lactis* encapsulado e não encapsulado após exposição a pH 1,5 de 0 a 120 min, posteriormente a pH 5,6 de 121 a 240 min e finalmente a pH 7,5 de 241 a 360 min, 37°C.

pH	Tempo (min)	Células encapsuladas				Células livres		
		Alginato log UFC/g	Alginato- quitosana 1 etapa log UFC/g	Alginato- quitosana- sureteric 0,1% log UFC/g	Alginato- quitosana-acryl- eze 0,1% log UFC/g	Células não encapsuladas desidratadas log UFC/g	Células liofilizadas tipo DVS log UFC/g	Células não encapsuladas em salina 0,85% log UFC/mL
1,5	0	9,80 ±0,16	9,50 ±0,29	9,60 ±0,45	9,60 ±0,36	9,00 ±0,39	10,57 ±0,05	9,25 ±0,18
	5	5,09 ±0,66	4,70 ±0,35	4,33 ±0,28	5,57 ±0,00	4,66 ±0,48	6,49 ±0,06	6,68 ±0,24
	15	5,06 ±0,11	5,19 ±0,16	5,41 ±0,14	5,72 ±0,17	≤2,00 ----	≤2,00 ----	4,90 ±0,20
	30	4,57 ±0,07	4,37 ±0,21	4,72 ±0,01	5,35 ±0,00	≤2,00 ----	≤2,00 ----	3,07 ±0,80
	60	≤2,00 ----	≤2,00 ----	≤2,00 ----	≤2,00 ----	≤2,00 ----	≤2,00 ----	≤2,00 ----
	120	≤2,00 ----	≤2,00 ----	≤2,00 ----	≤2,00 ----	≤2,00 ----	≤2,00 ----	≤2,00 ----
5,6	125	4,18 ±0,37	3,25 ±0,34	3,84 ±0,52	4,73 ±0,10	≤2,00 ----	≤2,00 ----	≤2,00 ----
	150	4,59 ±0,41	3,59 ±0,25	4,30 ±0,86	5,05 ±0,37	≤2,00 ----	≤2,00 ----	≤2,00 ----
	240	4,80 ±0,40	3,83 ±0,12	4,18 ±0,54	5,07 ±0,13	≤2,00 ----	≤2,00 ----	≤2,00 ----
7,5	245	4,74 ±0,92	4,36 ±1,02	4,59 ±0,38	4,77 ±0,12	≤2,00 ----	≤2,00 ----	≤2,00 ----
	270	5,34 ±0,55	4,91 ±0,84	5,33 ±0,62	5,56 ±0,47	≤2,00 ----	≤2,00 ----	≤2,00 ----
	360	5,69 ±0,30	5,21 ±0,53	5,59 ±0,59	6,02 ±0,54	≤2,00 ----	≤2,00 ----	≤2,00 ----

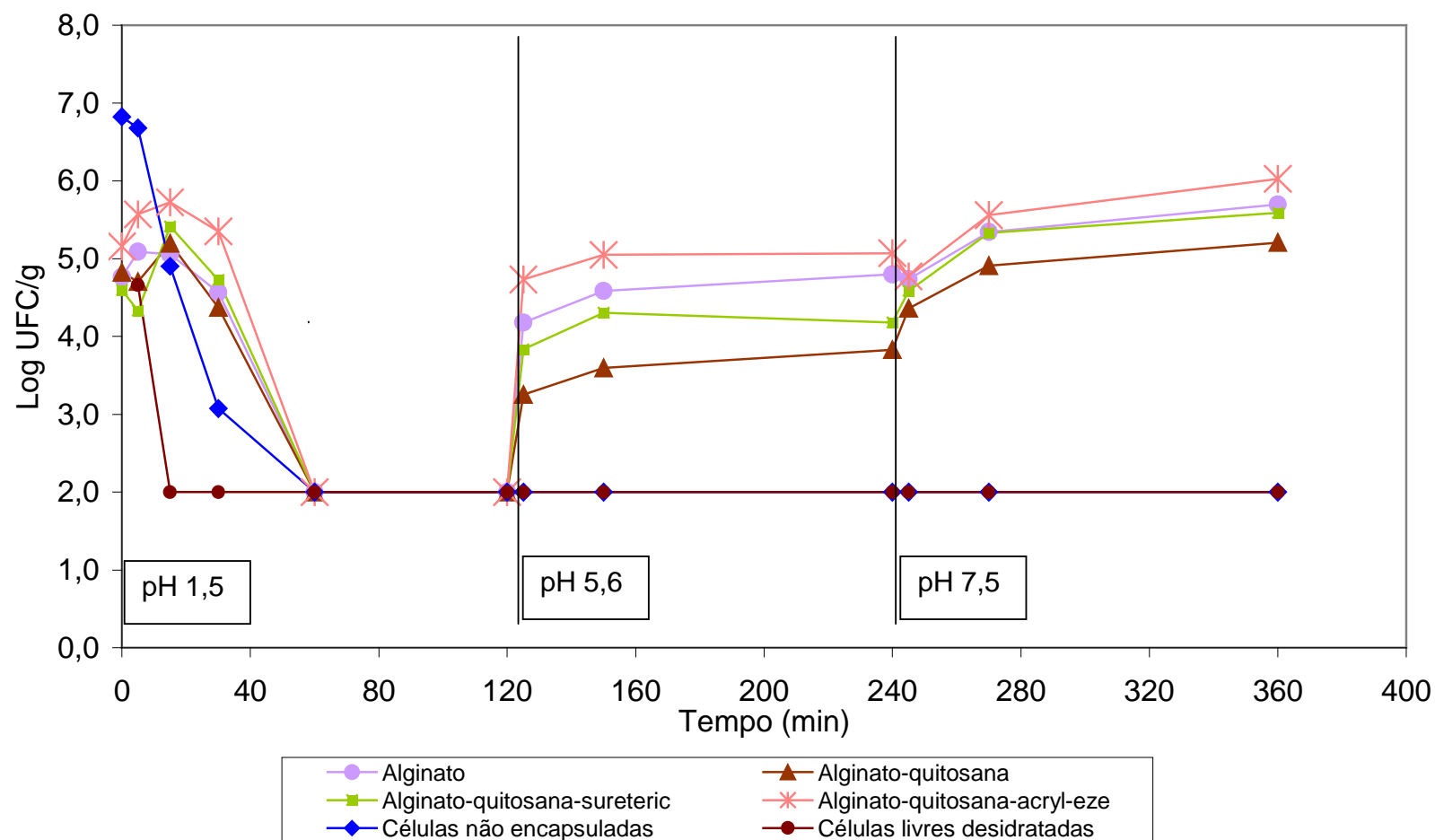


Figura 9. Populações de *B. lactis* (log UFC/g) liberadas das partículas e de microrganismos não encapsulados (log UFC/mL), expostos a pH 1,5 de 0 a 120 min, posteriormente a pH 5,6 de 121 a 240 min e finalmente a pH 7,5 de 241 a 360 min, 37°C.

4.5.2 Avaliação da liberação e sobrevivência de *B. lactis* em teste de simulação de fluidos gastrintestinais com a adição de enzimas

O fluxo gastrintestinal foi caracterizado com a utilização de soluções tampões pH 1,5, pH 5,6 e pH 7,5, com adição de pepsina (3g/L) e lipase (0,9mg/L) ao tampão pH 1,5 e de pancreatina (1g/L) e bile (10g/L) aos tampões pH 5,6 e 7,5. As populações de células sobreviventes e/ou liberadas das micropartículas após simulação de fluidos gastrintestinais com enzimas podem ser observadas na Tabela 6 e na Figura 10.

As populações de células liberadas em suco gástrico com enzimas (pH 1,5) mantiveram-se entre 4,23 e 4,96 log UFC/g após 2 horas, o que demonstra que células superficiais foram liberadas e resistiram parcialmente à extrema acidez do meio. Após a alteração do pH do meio, com simultânea adição de bile e pancreatina, as populações liberadas das partículas ficaram entre 5,13 e 6,69 log UFC/g após 120 min em pH 5,6, sendo os valores mínimo e máximo obtidos com as formulações alginato-quitosana e alginato, e entre 6,35 e 7,17 log UFC/g após 120 min em pH 7,5, com as formulações alginato-quitosana e alginato-quitosana-acryl-eze, respectivamente.

Com uma análise qualitativa dos resultados, chegou-se a conclusão que as partículas de alginato e alginato-quitosana-acryl-eze foram as que protegeram ou liberaram de forma mais efetiva as células nas condições testadas. Todavia, as diferenças entre as contagens obtidas com todas as formulações testadas foram muito pequenas, menores que 0,8 ciclos logarítmicos após 120 min em pH 7,5. Além disso, pode-se notar que em pH 5,6 as células encapsuladas em alginato foram totalmente liberadas, o que pode ser um fator negativo para a sua aplicação em bebidas lácteas que possuem pH em torno de 4,0 a 5,0.

Durante o tratamento com a solução gástrica, as células encapsuladas sofreram uma redução de 2,43 a 3,15 log UFC/g para as formulações alginato-quitosana-acryl-eze e alginato-quitosana, respectivamente, o que demonstra que a adição de enzimas de alguma forma contribuiu para aumentar o fator de proteção

das células, pois a redução da população de células encapsuladas nas mesmas condições sem a adição de enzimas foi de 3,58 a 4,29 log UFC/g (vide item 4.5.1).

A sobrevivência de microrganismos não encapsulados variou de acordo com o grau de injúria celular. Células acondicionadas em salina 0,85% apresentaram maior resistência à solução gástrica do que células encapsuladas, situação que não ocorreu quando o teste foi realizado em soluções tampão sem enzimas. As populações de *B. lactis* na forma de células livres acondicionadas em salina sofreram apenas uma pequena redução de 9,2 para 8,8 log UFC/ml quando expostas às soluções gástricas. Células desidratadas, as quais passaram pelo mesmo processo de secagem utilizado para células encapsuladas, sofreram redução de 3,45 logUFC/g após terem sido expostas a pH 1,5, 5,6 e 7,5 durante as 6 horas de tratamento. Por outro lado, células liofilizadas do tipo DVS (*Direct Vat Set*) com contagem inicial de 10,57 log UFC/ml foram reduzidas a menos que 2 log UFC/ml (limite de detecção do teste) após 120 minutos de exposição à solução gástrica (Tabela 6).

Pode-se afirmar que proteínas do leite ficaram aderidas às células mesmo após a lavagem com salina 0,85% por duas vezes após o cultivo, pois, durante a fermentação, o leite coagulou com a acidificação. Esses resultados demonstram que a tolerância das bactérias às soluções ácidas está diretamente relacionada ao grau de injúria celular, à presença de substâncias protetoras no leite e principalmente à ação da pepsina no suco gástrico. Sem a presença de pepsina, as populações de células livres cultivadas em leite foram reduzidas rapidamente a valores inferiores ao limite de detecção do teste (≤ 100 UFC/ml) em soluções com pH 1,5.

Esses resultados são coerentes com a observação de Conway *et al.* (1987) que mostraram que bactérias sobrevivem melhor em suco gástrico humano do que em tampões a um mesmo pH, indicando que estudos que utilizam tampões subestimam o potencial de sobrevivência das bactérias *in vivo*. Mccomas e Gilliland (2003) notaram que as proteínas hidrolisadas do soro causaram aumento significativo na multiplicação de *Bifidobacterium longum* S9, *L. acidophilus* O16 e *L. acidophilus* L-1 em iogurte, o que demonstra que essas bactérias apresentam baixa atividade proteolítica.

Charteris *et al.* (1998) afirmaram que as proteínas do leite e a mucina podem atuar como agentes protetores de bactérias probióticas em suco gástrico. Esses pesquisadores observaram que *L. casei* 2123 e *Bifidobacterium infantis* 25962 apresentaram 100% de resistência aos fluidos simulados do trato gastrointestinal em presença de proteínas do leite.

Kos *et al.* (2000) estudaram a influência da mucina e constituintes do leite, como caseína, proteínas concentradas do soro e leite desnatado, sobre a sobrevivência de *L. acidophilus* M92 em condições simuladas do trato gastrointestinal com a adição de pepsina, pancreatina e oxgall. Uma maior tolerância aos fluidos gástricos e intestinais foi observada na presença de mucina e proteínas do leite. Os resultados desses pesquisadores mostraram que em suco gástrico simulado com pH 2,0 a população de *L. acidophilus* M92 sofreu redução de aproximadamente 4,0 log UFC/ml após 2 horas de incubação, e com a adição de caseína e proteínas concentradas do soro, a redução da população desse microrganismo foi de no máximo 1,0 log UFC/ml.

Guerin *et al.* (2003), por outro lado, chegaram a resultados diferentes com a adição de pepsina. Eles pesquisaram a sobrevivência de células de *Bifidobacterium bifidum* encapsuladas em um gel composto por alginato, pectina e proteínas do soro, após permanência em suco gástrico simulado (pH 1,5 e pH 2,5) com adição de pepsina (10U/ml). Após 1h em pH 1,5, células livres e encapsuladas não foram mais recuperadas, enquanto em pH 2,5 células imobilizadas decresceram aproximadamente 2 ciclos logarítmicos, mas as células livres não sobreviveram após 2h de incubação. Nesse caso, portanto, a pepsina não proporcionou nenhum efeito protetor sobre a bactéria, porém a espécie utilizada foi outra.

Comparando os resultados obtidos com células encapsuladas e células livres, nota-se que a encapsulação não aumentou a resistência de *B. lactis* nas condições testadas considerando-se células acondicionadas em salina. Por outro lado, células encapsuladas também sofreram injúrias com o processo de desidratação e, quando os resultados são comparados com os obtidos com células livres liofilizadas ou desidratadas, verifica-se que nesse caso a encapsulação aumentou a resistência das células. Células livres desidratadas

foram recuperadas com uma população de 5,35 log UFC/mL após o teste completo de simulação do trato gastrintestinal, enquanto com as micropartículas foram recuperadas populações de 6,35, 6,59, 6,83 e 7,17 log UFC/mL após o ensaio, considerando-se as formulações alginato-quitosana, alginato-quitosana-sureteric 0,1%, alginato e alginato-quitosana-acryl-eze 0,1%, respectivamente.

Tabela 6. Populações de *B. lactis* encapsulado e não encapsulado após exposição a pH 1,5 de 0 a 120 min, posteriormente a pH 5,6 de 121 a 240 min e finalmente a pH 7,5 de 241 a 360 min, 37°C com adição de enzimas do trato gastrointestinal (pepsina e lipase no tampão pH 1,5 e pancreatina e bile nos tampões pH 5,6 e 7,5).

pH	Tempo (min)	Células encapsuladas				Células livres				
		Alginato log UFC/g	Alginato- quitosana 1 etapa log UFC/g	Alginato- quitosana- sureteric 0,1% log UFC/g	Alginato- quitosana-acryl- eze 0,1% log UFC/g	Células não encapsuladas desidratadas log UFC/g	Células liofilizadas tipo DVS log UFC/g	Células não encapsuladas em salina log UFC/ml		
1,5	0	9,8 ±0,16	9,5 ±0,29	9,6 ±0,45	9,6 ±0,36	9,0 ±0,39	10,57 ±0,05	9,25 ±0,18		
	5	4,93 ±0,21	4,61 ±0,11	4,83 ±0,25	5,23 ±0,25	4,42 ±0,18	6,62 ±0,27	8,95 ±0,12		
	15	4,37 ±0,10	4,41 ±0,13	4,71 ±0,02	4,96 ±0,33	4,46 ±0,41	4,30 ±0,15	8,97 ±0,03		
	30	4,35 ±0,20	4,14 ±0,84	4,56 ±0,76	4,89 ±0,48	4,99 ±0,27	3,04 ±0,29	9,00 ±0,12		
	60	4,16 ±0,71	4,62 ±0,49	4,61 ±0,89	5,04 ±0,29	5,16 ±0,14	2,63 ±0,06	9,03 ±0,18		
	120	4,28 ±0,47	4,23 ±0,70	4,59 ±0,67	4,96 ±0,41	5,61 ±0,06	< 2,00	8,83 ±0,26		
5,6	125	6,44 ±0,52	4,91 ±0,20	5,37 ±0,13	5,45 ±0,31	4,54 ±0,40	< 2,00	----	----	----
	150	6,79 ±0,56	5,11 ±0,02	5,37 ±0,29	5,51 ±0,52	4,73 ±0,73	< 2,00	----	----	----
	240	6,69 ±0,64	5,13 ±0,36	5,40 ±0,22	5,41 ±0,30	4,72 ±0,84	< 2,00	----	8,81 ±0,18	
7,5	245	6,60 ±0,66	6,19 ±0,33	6,15 ±0,43	7,06 ±0,24	4,77 ±0,44	< 2,00	----	----	----
	270	6,78 ±0,40	6,29 ±0,38	6,53 ±0,76	6,94 ±0,49	4,65 ±0,78	< 2,00	----	----	----
	360	6,83 ±0,26	6,35 ±0,58	6,59 ±0,66	7,17 ±0,47	5,35 ±1,05	< 2,00	----	8,80 ±0,25	

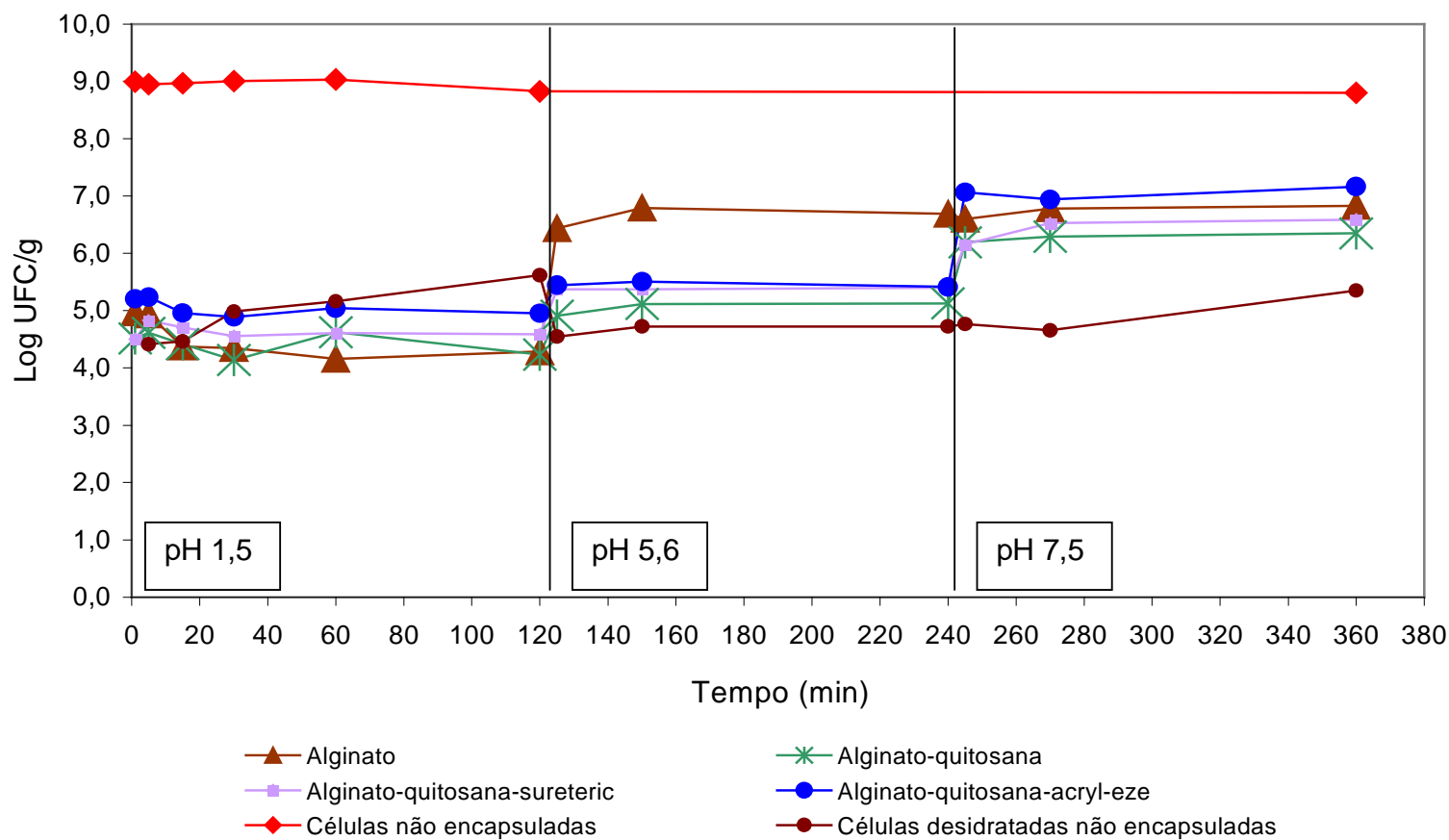


Figura 10. Populações de *B. lactis* (log UFC/g) liberadas das partículas e de microrganismos não encapsulados (log UFC/mL), expostos a pH 1,5 de 0 a 120 min, posteriormente a pH 5,6 de 121 a 240 min e finalmente a pH 7,5 de 241 a 360 min, 37°C, com adição de pepsina no tampão pH 1,5 e de pancreatina e bile nos tampões pH 5,6 e 7,5.

4.6 Efeito da microencapsulação na sobrevivência de *Bifidobacterium lactis* em leite fermentado e em leite fermentado submetido a condições simuladas do trato gastrointestinal

Os resultados obtidos com os testes de simulação do trato gastrointestinal demonstraram que as técnicas de microencapsulação utilizadas podem aumentar a resistência de *B. lactis* em soluções tampão com pH 1,5 sem a adição de enzimas, e que a adição de pepsina aumenta a tolerância dessa bactéria em soluções simuladas de suco gástrico. Entretanto, o grau de injúria celular deve ser considerado no momento do consumo, e portanto, está diretamente relacionado ao produto em que a bactéria será adicionada. Por esse motivo foi feita uma avaliação da aplicação tecnológica de células de *B. lactis* encapsuladas em leite fermentado, e da resistência destas bactérias adicionadas ao leite fermentado em condições simuladas do suco gástrico humano. Células livres e encapsuladas foram adicionadas ao leite fermentado e alíquotas foram retiradas semanalmente deste produto para análise da população microbiana e simulação da passagem do produto pelo trato gastrointestinal.

Os resultados indicaram que na ausência de pepsina, as populações de *B. lactis* nos leites fermentados foram reduzidas drasticamente após o contato com tampão pH 1,5, não sendo possível a detecção de células viáveis após 120 minutos. A presença de pepsina influenciou positivamente a recuperação de células viáveis de *B. lactis* em todas as condições testadas, e as culturas desidratadas apresentaram melhores resultados que as culturas microencapsuladas ou liofilizadas. No caso do leite fermentado contendo as células desidratadas, a população de *B. lactis*, após o tratamento em suco gástrico com enzimas, foi superior à detectada no produto antes desse tratamento (itens 4.6.1 e 4.6.2.)

4.6.1 Sobrevivência de células de *Bifidobacterium lactis* livres e microencapsuladas em leite fermentado

As populações de *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* presentes no leite fermentado durante 4 semanas de armazenagem sob refrigeração estão apresentadas na Tabela 7. Pode-se notar que no primeiro dia de estocagem, os leites fermentados apresentaram populações de *B. lactis* de 8,50, 6,18, 6,17 e 5,49 log UFC/ml para as formulações com células liofilizadas, células desidratadas, células encapsuladas em alginato-quitosana-acryl-eze e células encapsuladas em alginato-quitosana, respectivamente. Essas populações foram reduzidas gradativamente, principalmente após a segunda semana de estocagem, chegando a 5,02, 5,78, 5,15 e 4,97 log UFC/ml após 14 dias e a 3,21, 5,35, 4,28 e 2,98 log UFC/ml após 28 dias, respectivamente.

Também é importante ressaltar que na formulação com células liofilizadas ocorreu redução de 8,5 a 3,21 ciclos logarítmicos após 4 semanas de estocagem, uma diferença de 5,29 log UFC/ml, enquanto na formulação com células desidratadas houve uma redução de 6,18 a 5,35, diferença de 0,83 log UFC/ml (Tabela 7 e Figura 11), no mesmo período. Com esses resultados, nota-se que as populações de células desidratadas mantiveram-se mais estáveis que as populações de células liofilizadas no leite fermentado.

Fazendo a mesma comparação anterior com as formulações com células encapsuladas em alginato-quitosana e alginato-quitosana-acryl-eze, no primeiro caso houve redução de 5,49 a 2,98 log UFC/ml (2,51 log de diferença) e no segundo caso redução de 6,17 a 4,28 (1,89 log de diferença). Observa-se que a encapsulação com alginato-quitosana-acryl-eze foi mais eficiente que a encapsulação com alginato-quitosana na proteção às células de *B. lactis* em leite fermentado. Entretanto, células desidratadas, em comparação com as células encapsuladas, apresentaram contagens mais altas de *B. lactis* durante o período de armazenamento (Tabela 7 e Figura 11).

Com relação ao *L. bulgaricus*, notou-se que as populações deste microrganismo mantiveram-se praticamente estáveis na ordem de 8 logUFC/ml

para as formulações com células encapsuladas, mas por outro lado, nas formulações com células livres, as populações deste microrganismo foram reduzidas de 8,5 logUFC/ml a aproximadamente 6 logUFC/ml após 4 semanas de estocagem (Tabela 7). Este fato mostra que as células livres de *B. lactis* devem ter influenciado negativamente a sobrevivência de *L. bulgaricus* no leite fermentado.

Com relação às populações de *Streptococcus lactis*, considerando as análises em ágar ST, obteve-se contagens na ordem de 8 a 9 logUFC/ml, e apenas na formulação com células liofilizadas, ocorreu uma redução a 6,5 logUFC/ml após 4 semanas de estocagem (Tabela 7).

O pH dos leites fermentados variou de 4,2 na primeira semana a 3,9 na quarta semana de armazenamento.

Na literatura encontram-se resultados contraditórios em relação à sobrevivência de bifidobactérias encapsuladas em iogurte.

Adhikari *et al.* (2000, 2003) adicionaram células vivas de *Bifidobacterium longum* microencapsuladas em κ -caragena em iogurte após o processo de fermentação e estocaram o produto a 4,4°C por 30 dias. Os resultados do estudo mostraram que não houve declínio no número de bactérias encapsuladas, porém a redução no número de células livres foi significativa no iogurte (89,3% para *B. longum* B6 e 91,8% para *B. longum* ATCC 15708). Esses pesquisadores concluíram que a microencapsulação protegeu as bifidobactérias do baixo pH do produto, aumentando a sua viabilidade durante o período de estocagem, mas a análise sensorial do produto revelou que a presença de micropartículas, com $235,8 \pm 25,6\mu\text{m}$, causou uma alteração na textura do produto, perceptível durante o consumo.

Sun e Griffiths (2000) relataram que contagens de células livres e imobilizadas (gomas xantana e gelana) não apresentaram diferenças significativas em iogurte durante as primeiras 4 semanas de estocagem, mas houve uma diferença significativa em favor das células encapsuladas observada ao final da quinta, sexta e sétima semana.

Favaro-Trindade (2000, 2001), por outro lado, encapsulou *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* em alginato de cálcio e em acetatoftalato de celulose e concluiu que a microencapsulação em acetatoftalato de celulose foi

efetiva na proteção desses microrganismos em soluções ácidas, embora não tenha sido eficiente quando *B. lactis* microencapsulado foi inoculado em iogurte.

Sultana *et al.* (2000) encapsularam *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. com uma mistura de alginato 2% preparada com 2% de amido de milho (*Hi-maize*, um prebiótico) para aplicação em iogurte. Esse estudo mostrou um declínio nas células viáveis de 0,5 log para células encapsuladas e de 1 log para células livres em iogurte após 8 semanas de armazenamento sob refrigeração. Também não houve um aumento significativo na sobrevivência quando as células encapsuladas foram sujeitas à alta acidez e sais de bile.

Iyer e Kailasapathy (2005) relataram que a microencapsulação de *Lactobacillus* spp. com *Hi-maize* (1%p/v) nas partículas e posterior recobrimento com quitosana aumentaram significativamente a sobrevivência de bactérias encapsuladas em iogurte estocado por 6 semanas, em comparação com células encapsuladas em alginato.

No atual estudo, nota-se que a microencapsulação não foi uma técnica efetiva para aumentar a taxa de sobrevivência de *B. lactis* em leites fermentados.

Tabela 7. População de *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* em leite fermentado (log UFC/ml) durante 4 semanas de armazenamento sob refrigeração.

Microrganismo	Tratamento*	Tempo de tratamento (semanas)				
		0	1	2	3	4
<i>Bifidobacterium lactis</i>	A	8,50±0,04	7,76±0,06	5,02±0,11	4,30±0,23	3,21±0,38
	B	6,18±0,09	6,03±0,25	5,78±0,14	5,59±0,03	5,35±0,01
	C	5,49±0,15	5,29±0,08	4,97±0,11	3,67±0,16	2,98±0,26
	D	6,17±0,27	5,64±0,11	5,15±0,02	4,33±0,18	4,28±0,21
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	A	8,48±0,05	8,54±0,05	8,31±0,02	6,95±0,05	5,61±0,11
	B	8,63±0,09	8,53±0,04	8,42±0,02	7,91±0,11	6,58±0,08
	C	8,53±0,04	8,50±0,01	8,46±0,06	8,41±0,03	8,06±0,11
	D	8,32±0,11	8,29±0,19	8,41±0,17	8,33±0,04	8,22±0,04
<i>Streptococcus thermophilus</i> (contagem em ágar ST)	A	8,86±0,06	8,94±0,10	8,60±0,11	7,98±0,26	6,50±0,16
	B	8,90±0,08	8,86±0,02	8,83±0,01	8,70±0,04	8,51±0,09
	C	8,41±0,70	8,98±0,03	8,77±0,06	8,24±0,16	7,88±0,31
	D	8,40±0,42	9,01±0,02	8,91±0,05	8,65±0,22	8,13±0,26
<i>Streptococcus thermophilus</i> (contagem em ágar M17)	A	8,70±0,03	8,93±0,09	7,40±0,33	7,68±0,30	5,56±0,26
	B	8,78±0,11	8,84±0,05	8,09±0,29	8,74±0,07	6,44±0,29
	C	8,93±0,04	7,27±0,13	6,91±0,21	6,35±0,32	7,09±0,37
	D	9,01±0,03	7,61±0,14	6,83±0,32	7,37±0,88	7,21±0,48

*Leites fermentados com *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* foram enriquecidos com culturas de *Bifidobacterium lactis* submetidas a quatro tratamentos diferentes: liofilização (A), desidratação em temperatura ambiente (B), encapsulação em alginato-quitosana (C) e encapsulação em alginato-quitosana-acryl-eze (D).

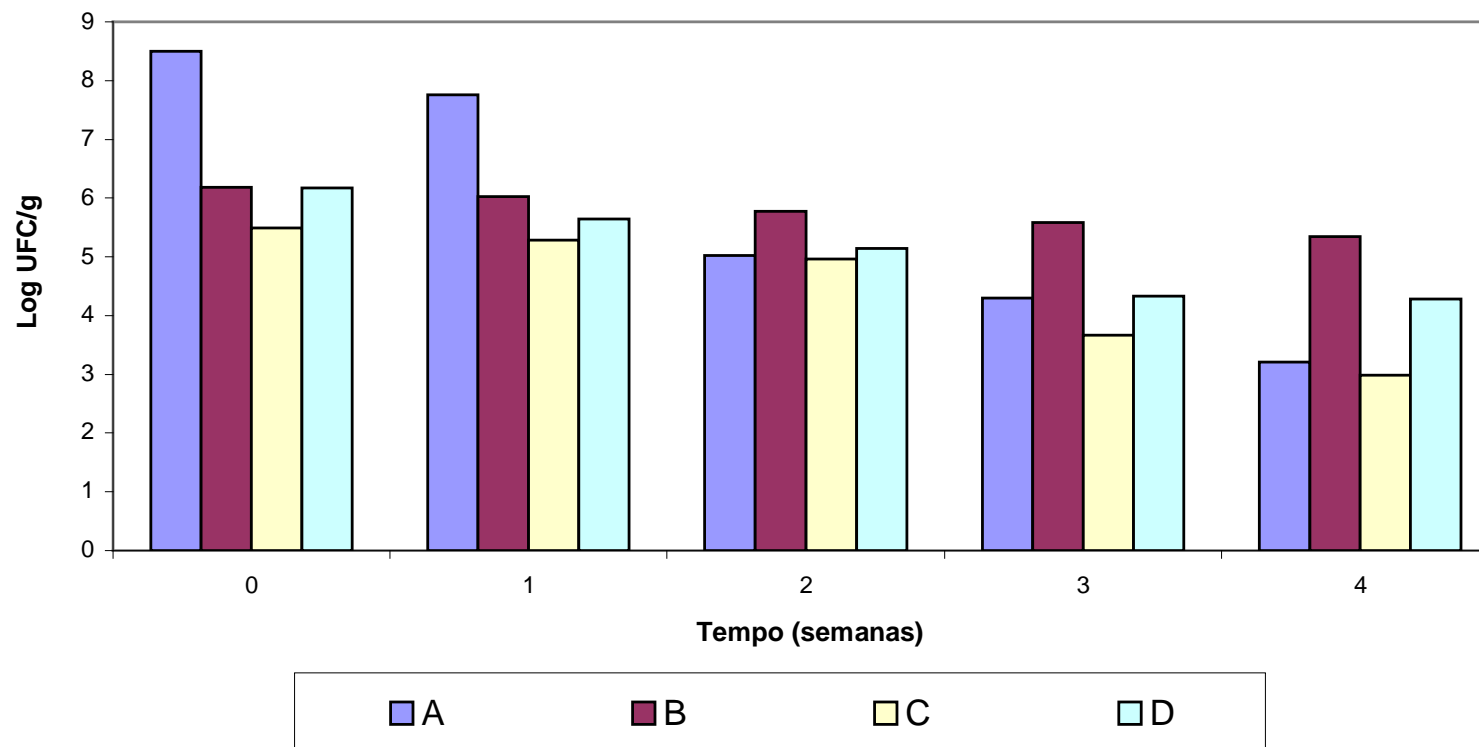


Figura 11. População de células de *B. lactis* (logUFC/mL) liofilizadas (A), desidratadas (B), encapsuladas em alginato-quitosana (C) e encapsuladas em alginato-quitosana-acryl-eze (D) em leite fermentado após 0, 1, 2, 3 e 4 semanas de estocagem em refrigeração.

4.6.2 Sobrevivência de células de *Bifidobacterium lactis* livres e microencapsuladas em leite fermentado submetido a condições simuladas de suco gástrico com e sem a adição de enzimas

A sobrevivência de *B. lactis* em leite fermentado foi avaliada em condições simuladas de suco gástrico com e sem a adição de enzimas. Em relação ao teste de simulação de suco gástrico sem a adição de enzimas (Tabela 8), as populações de *B. lactis* foram reduzidas drasticamente após o contato com o tampão pH 1,5, e não houve recuperação de células após 120 min de exposição a esse meio em todas as amostras testadas, com exceção do leite fermentado com células encapsuladas em alginato-quitosana-acryl-eze, para o qual recuperou-se apenas 1,42 log UFC/ml após mudança de pH a 7,5, valor muito baixo. Considerando-se os dados obtidos após 30 min de reação em pH 1,5, a melhor taxa de recuperação ocorreu no iogurte produzido com células desidratadas não encapsuladas, chegando a 5,26 log UFC/mL no primeiro dia de estocagem, porém notou-se uma queda acentuada na recuperação de células em pH 1,5 ao longo da vida-de-prateleira do produto (Tabela 8).

Em relação ao teste de simulação de suco gástrico com a adição de enzimas (Tabela 9 e Figura 12), nota-se que a presença da pepsina (3g/L) e do leite influenciaram de forma significativa a recuperação de células de *B. lactis*. O melhor resultado foi obtido com as células desidratadas não encapsuladas, as quais foram recuperadas com uma população de até 7 log UFC/ml no primeiro dia de estocagem e de 5,8 logUFC/ml após 4 semanas de estocagem (Figura 14).

Utilizando-se a formulação com alginato-quitosana-acryl-eze após 1 dia de estocagem foram recuperados 6,13 log UFC/ml após o teste em suco gástrico com enzimas, porém a população recuperada de *B. lactis* decresceu durante o tempo de estocagem chegando a 2,9 logUFC/ml após 4 semanas, nas mesmas condições (Figura 16). Considerando a formulação com alginato-quitosana, a qual foi menos eficaz ainda na proteção às células de *B. lactis*, foram recuperados 5,27 log UFC/ml após 1 dia e 1,2 log UFC/ml após 4 semanas de estocagem (Figura

15). No leite fermentado suplementado com células liofilizadas, recuperou-se 4,25 log UFC/mL de *B. lactis* após 1 dia e <1 log UFC/mL (limite de detecção do teste) após 3 semanas de estocagem (Figura 13). Esse fato indica que, apesar da obtenção de uma população de *B. lactis* de aproximadamente 8 log UFC/mL no leite fermentado por até 1 semana de estocagem, as células de *B. lactis* liofilizadas não apresentaram resistência ao suco gástrico.

Notou-se também o perfil de liberação controlada para células encapsuladas, que partiram de uma população baixa em pH 1,5 a uma população mais alta em pH 7,5, o que comprova que as células não foram liberadas totalmente em pH 1,5 e 5,6 (Figura 15 e Figura 16). Porém a mortalidade de células devido à injúria já agregada no processo de encapsulação, à ação da acidez do próprio iogurte e à ação da acidez do suco gástrico tornaram esse efeito menos perceptível com o decorrer da vida-de-prateleira do produto. Esse perfil de liberação só é bem delineado em até 1 semana de estocagem (tabela 9, figura 15 e 16).

Outro fato relevante é que, no leite fermentado suplementado com células desidratadas, a população de *B. lactis*, após o tratamento em suco gástrico com enzimas, foi superior à detectada no produto antes desse tratamento. Esse fato indica que a presença de substâncias protetoras e/ou nutrientes na mistura suco gástrico-leite promovem a multiplicação de *B. lactis*. A pepsina, provavelmente, atuou sobre as moléculas de proteínas formando peptídeos e/ou aminoácidos, tornando estes nutrientes mais biodisponíveis para as bactérias. Neste caso, pode-se levantar também a hipótese que a microencapsulação pode inibir o contato da bactéria com os nutrientes tão necessários para a sua multiplicação e, conseqüentemente, prejudicar a sua sobrevivência causando um efeito inverso ao esperado.

Na literatura alguns trabalhos evidenciam a natureza não proteolítica de algumas bactérias probióticas, o que torna a sua multiplicação lenta e dependente da utilização de suplementos.

Dave e Shah (1998) afirmaram que a adição de cisteína, concentrado de proteínas do soro, hidrolisado ácido de caseína ou triptona aumentaram a viabilidade de bifidobactérias durante o processo de fermentação. Mccomas e

Gilliland (2003), como já foi citado, também notaram que as proteínas hidrolisadas do soro causaram aumento significativo na multiplicação de *Bifidobacterium longum* S9, *L. acidophilus* O16 e *L. acidophilus* L-1 em iogurte, o que demonstra que essas bactérias apresentam baixa atividade proteolítica.

Sihata e Shah (2000) relataram que *Bifidobacterium* spp. podem ser classificadas como culturas não proteolíticas e este fato pode explicar porque a multiplicação de bifidobactérias requer suplementação de peptídeos e de aminoácidos. Segundo esses autores, ainda, as bactérias do iogurte (*Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) são altamente proteolíticas quando comparadas com bactérias probióticas (especificamente *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp.), pois elas liberam altas concentrações de aminoácidos livres e demonstram maior atividade de aminopeptidases e de dipeptidases. Como resultado, bactérias de iogurte multiplicam-se mais rápido em leite do que bactérias probióticas que requerem um suplemento de peptídeos e aminoácidos para aumentar a sua taxa de crescimento.

Lima (2005) estudou a resistência de bactérias probióticas à passagem pelo trato gastrointestinal empregando modelos simulados constituídos por solução de NaCl (0,5%p/v) contendo pepsina no suco gástrico (pH 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0) e pancreatina e bile no suco entérico (pH 8,0). Os resultados de sua pesquisa revelaram que a transferência das células para o suco entérico resultou na reversão parcial da injúria causada pelo suco gástrico e, além disso, foi demonstrado que o leite pode proteger as bactérias do estresse decorrente da passagem pelo trato gastrointestinal simulado.

Pode-se, então, sugerir que com a atuação da pepsina sobre o leite fermentado houve a liberação de peptídeos e/ou aminoácidos que intensificaram a multiplicação de *B. lactis* causando a recuperação de células injuriadas e promovendo a sua multiplicação.

Tabela 8. População de células de *B. lactis* (log UFC/mL) liofilizadas (A), desidratadas (B), encapsuladas em alginato-quitosana (C) e encapsuladas em alginato-quitosana-acryl-eze (D) em leite fermentado antes e após exposição a suco gástrico simulado (37°C, 150rpm) sem adição de enzimas gástricas e entéricas com 0, 1, 2, 3 e 4 semanas de estocagem em refrigeração.

Tratamento	Tempo (min)	pH	Tempo (semanas)				
			0	1	2	3	4
A	0		8,50	7,76	5,02	4,30	3,21
	30	1,5	4,78	3,34	1,58	≤1,00	≤1,00
	120	1,5	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00
	240	5,6	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00
	360	7,5	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00
B	0		6,18	6,03	5,78	5,59	5,35
	30	1,5	5,26	4,25	3,34	3,09	3,12
	120	1,5	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00
	240	5,6	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00
	360	7,5	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00
C	0		5,49	5,29	4,97	3,67	2,98
	30	1,5	3,21	2,58	1,62	2,02	≤1,00
	120	1,5	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00
	240	5,6	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00
	360	7,5	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00
D	0		6,17	5,64	5,15	4,33	4,28
	30	1,5	3,65	3,2	2,36	2,12	1,50
	120	1,5	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00
	240	5,6	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00
	360	7,5	1,42	≤1,00	≤1,00	≤1,00	≤1,00

Tabela 9. População de células de *B. lactis* (log UFC/mL) liofilizadas (A), desidratadas (B), encapsuladas em alginato-quitosana (C) e encapsuladas em alginato-quitosana-acryl-eze (D) em leite fermentado antes e após exposição a suco gástrico simulado (37°C, 150rpm) com adição de pepsina e lipase no tampão pH1,5 e de pancreatina e bile nos tampões pH5,6 e 7,5 com 0, 1, 2, 3 e 4 semanas de estocagem em refrigeração.

Tratamento	Tempo (min)	pH	Tempo (semanas)				
			0	1	2	3	4
A	0		8,50 ^{Ai}	7,76 ^{Bg}	5,02 ^{Cg}	4,30 ^{Di}	3,21 ^{Ef}
	30	1,5	5,86 ^{Aak}	4,59 ^{Ba}	3,50 ^{Cab}	2,44 ^{Da}	1,50 ^{Eai}
	120	1,5	4,74 ^{Abh}	3,12 ^{Bb}	1,80 ^{Cc}	≤1,00 ^{Db}	≤1,00 ^{Db}
	240	5,6	4,24 ^{Ach}	3,04 ^{Bb}	1,77 ^{Cc}	≤1,00 ^{Db}	≤1,00 ^{Db}
	360	7,5	4,25 ^{Ach}	3,09 ^{Bb}	1,80 ^{Cc}	≤1,00 ^{Db}	≤1,00 ^{Db}
B	0		6,18 ^{Aj}	6,03 ^{ABh}	5,78 ^{BCh}	5,59 ^{CDd}	5,35 ^D
	30	1,5	6,93 ^{Ad}	7,10 ^{Ac}	6,93 ^{Ad}	6,36 ^{Bc}	5,76 ^{Cc}
	120	1,5	6,98 ^{Ad}	7,04 ^{Ac}	6,89 ^{ABd}	6,56 ^{Bc}	5,79 ^{Cc}
	240	5,6	7,02 ^{Ad}	6,99 ^{Ac}	6,60 ^{Bd}	5,70 ^{Cd}	5,47 ^{Cd}
	360	7,5	7,08 ^{Ad}	7,10 ^{Ac}	7,01 ^{Ad}	6,42 ^{Bc}	5,80 ^{Cc}
C	0		5,49 ^{Agk}	5,29 ^{ABf}	4,97 ^{Bg}	3,67 ^{Cg}	2,98 ^{Df}
	30	1,5	3,87 ^{Aef}	3,46 ^{Bce}	2,82 ^{Ce}	2,26 ^{Da}	1,78 ^{Eea}
	120	1,5	3,58 ^{Ae}	3,20 ^{Abc}	2,53 ^{Bef}	2,51 ^{Bae}	1,85 ^{Ce}
	240	5,6	3,96 ^{Af}	3,25 ^{Bbc}	2,21 ^{Cf}	2,10 ^{Ca}	1,19 ^{Dbi}
	360	7,5	5,27 ^{Ag}	4,58 ^{Ba}	2,85 ^{Ce}	2,67 ^{Ce}	1,20 ^{Dbi}
D	0		6,17 ^{Aj}	5,64 ^{Bf}	5,15 ^{Cg}	4,33 ^{Di}	4,28 ^{Dh}
	30	1,5	4,57 ^{Abch}	3,86 ^{Bd}	3,33 ^{Ca}	3,33 ^{Cfg}	3,02 ^{Df}
	120	1,5	4,19 ^{Ac}	3,79 ^{Bde}	3,25 ^{Ca}	2,92 ^{Deh}	2,48 ^{Eg}
	240	5,6	4,58 ^{Abch}	4,15 ^{Bd}	3,19 ^{Ca}	3,00 ^{Cfh}	1,81 ^{Dae}
	360	7,5	6,13 ^{Aaj}	5,43 ^{Bf}	3,76 ^{Cb}	3,51 ^{Cg}	2,90 ^{Df}

Obs: Para cada linha, valores relacionados com letras maiúsculas iguais não são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) e para cada coluna, valores relacionados com letras minúsculas iguais não são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

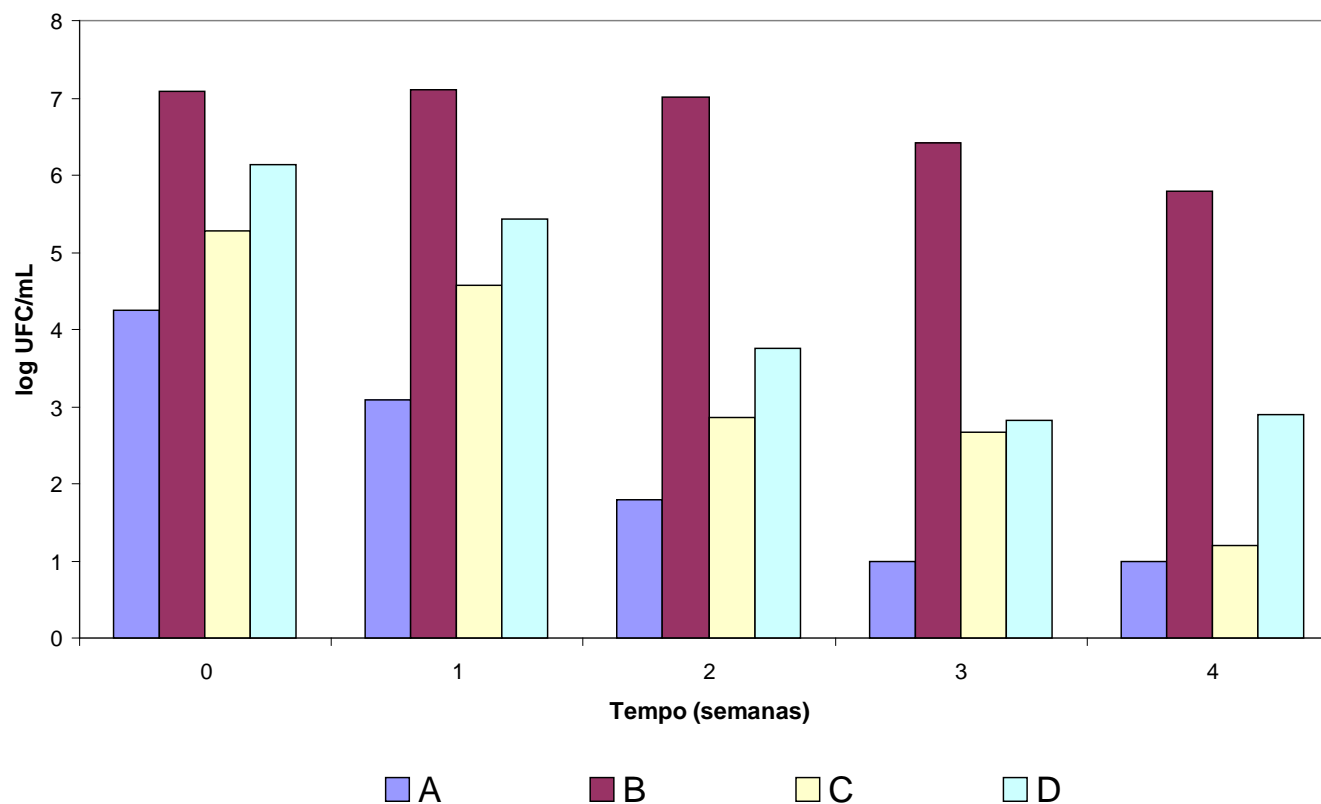


Figura 12. População de células de *B. lactis* (log UFC/mL) liofilizadas (A), desidratadas (B), encapsuladas em alginato-quitosana (C) e encapsuladas em alginato-quitosana-acryl-eze (D) em leite fermentado estocado por 0, 1, 2, 3 e 4 semanas sob refrigeração, após tratamento com fluidos gastrintestinais simulados (pH 1,5-5,6-7,5, 37°C, 150rpm, 360 min) com adição de pepsina na solução pH 1,5 e de pancreatina e bile nas soluções pH 5,6 e pH 7,5.

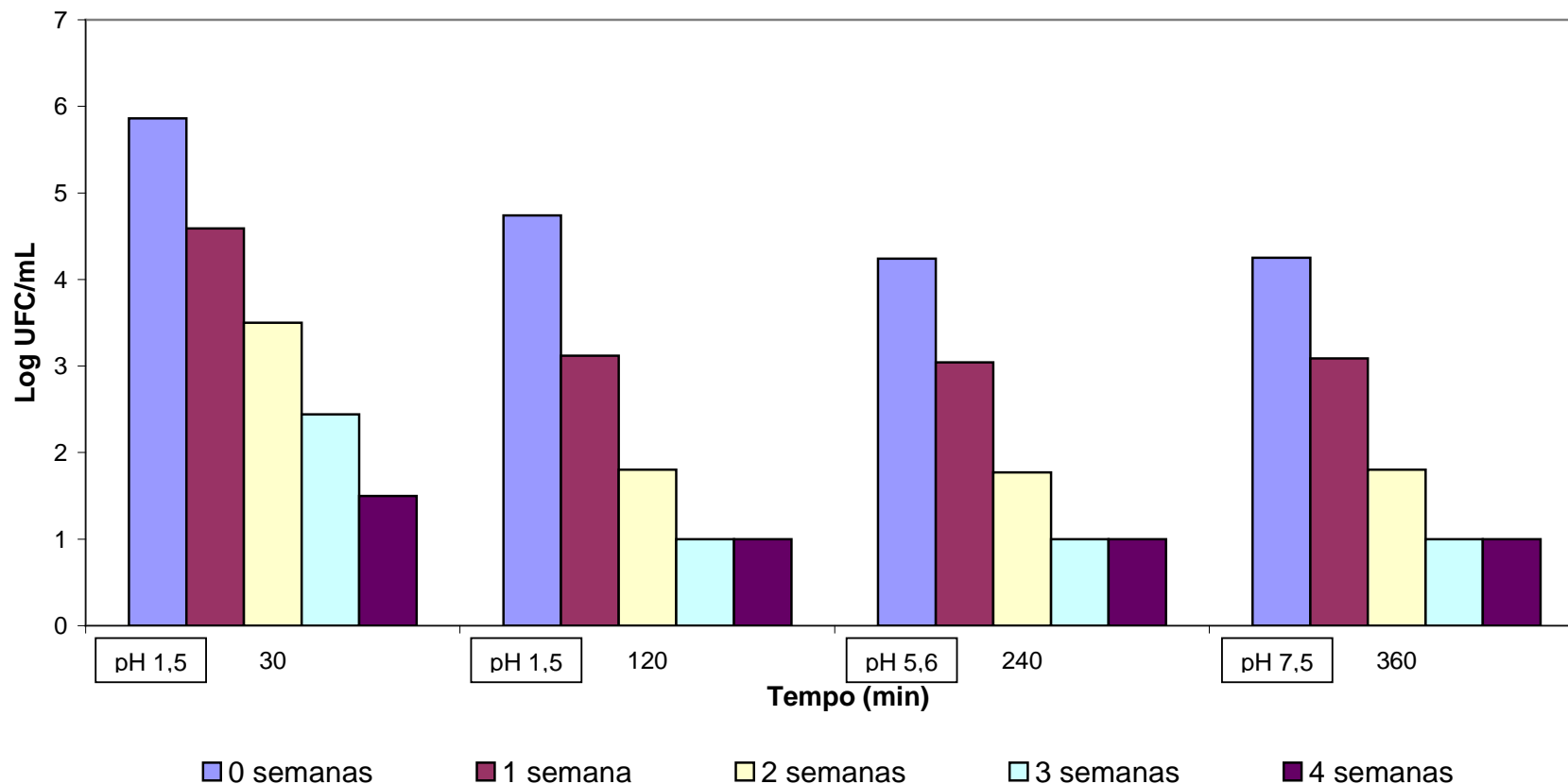


Figura 13. População de células liofilizadas de *B. lactis* (log UFC/mL) em leite fermentado estocado por 0, 1, 2, 3 e 4 semanas sob refrigeração, após exposição a pH 1,5 com 30 e 120 min, posteriormente a pH 5,6 de 121 a 240 min e finalmente a pH 7,5 de 241 a 360 min (37°C, 150 rpm), simulando um tratamento com fluidos gastrintestinais com adição de enzimas e bile (pepsina e lipase no tampão pH 1,5 e pancreatina e bile nos tampões pH 5,6 e 7,5).

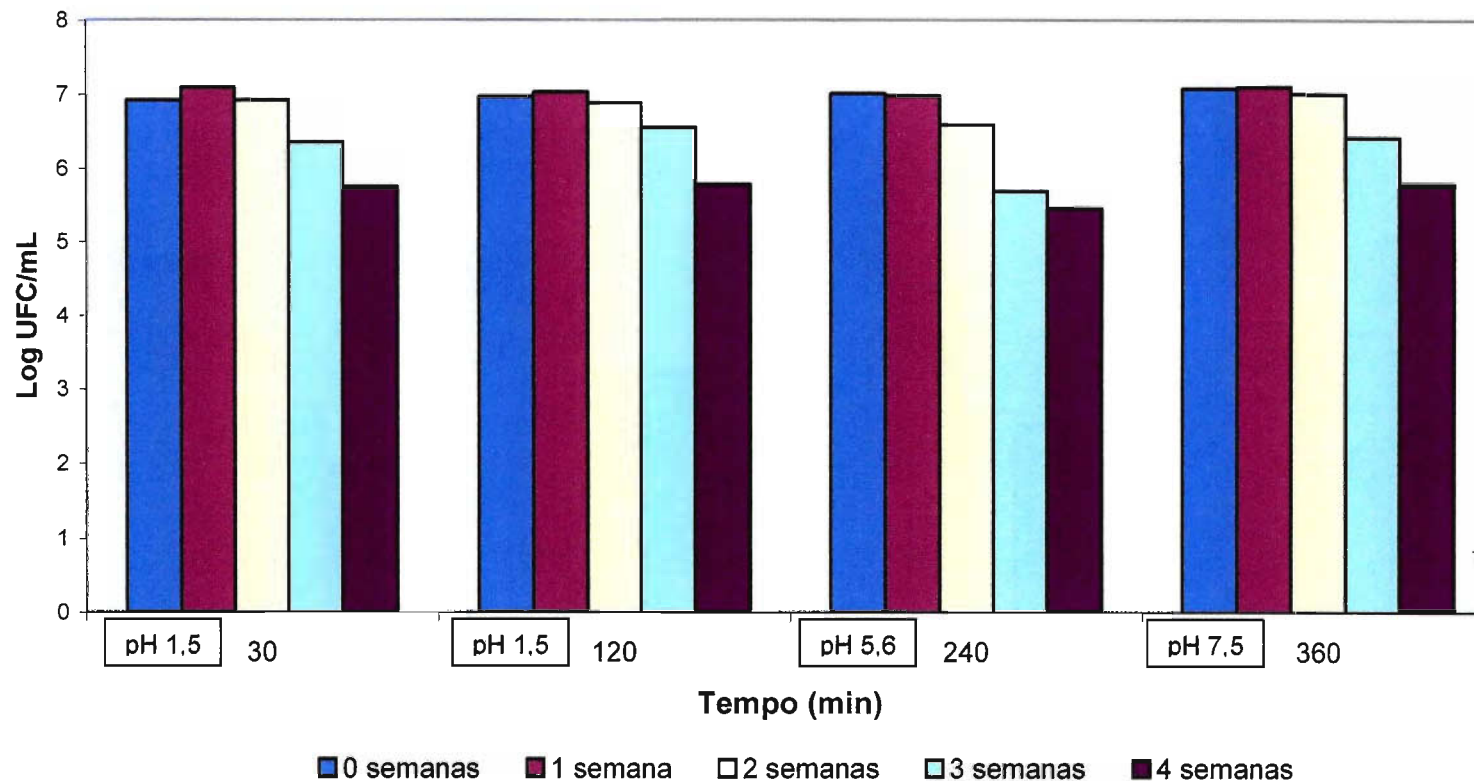


Figura 14. População de células desidratadas de *B. lactis* (log UFC/mL) em leite fermentado estocado por 0, 1, 2, 3 e 4 semanas sob refrigeração, após exposição a pH 1,5 com 30 e 120 min, posteriormente a pH 5,6 de 121 a 240 min e finalmente a pH 7,5 de 241 a 360 min (37°C, 150 rpm), simulando um tratamento com fluidos gastrintestinais com adição de enzimas e bile (pepsina e lipase no tampão pH 1,5 e pancreatina e bile nos tampões pH 5,6 e 7,5).

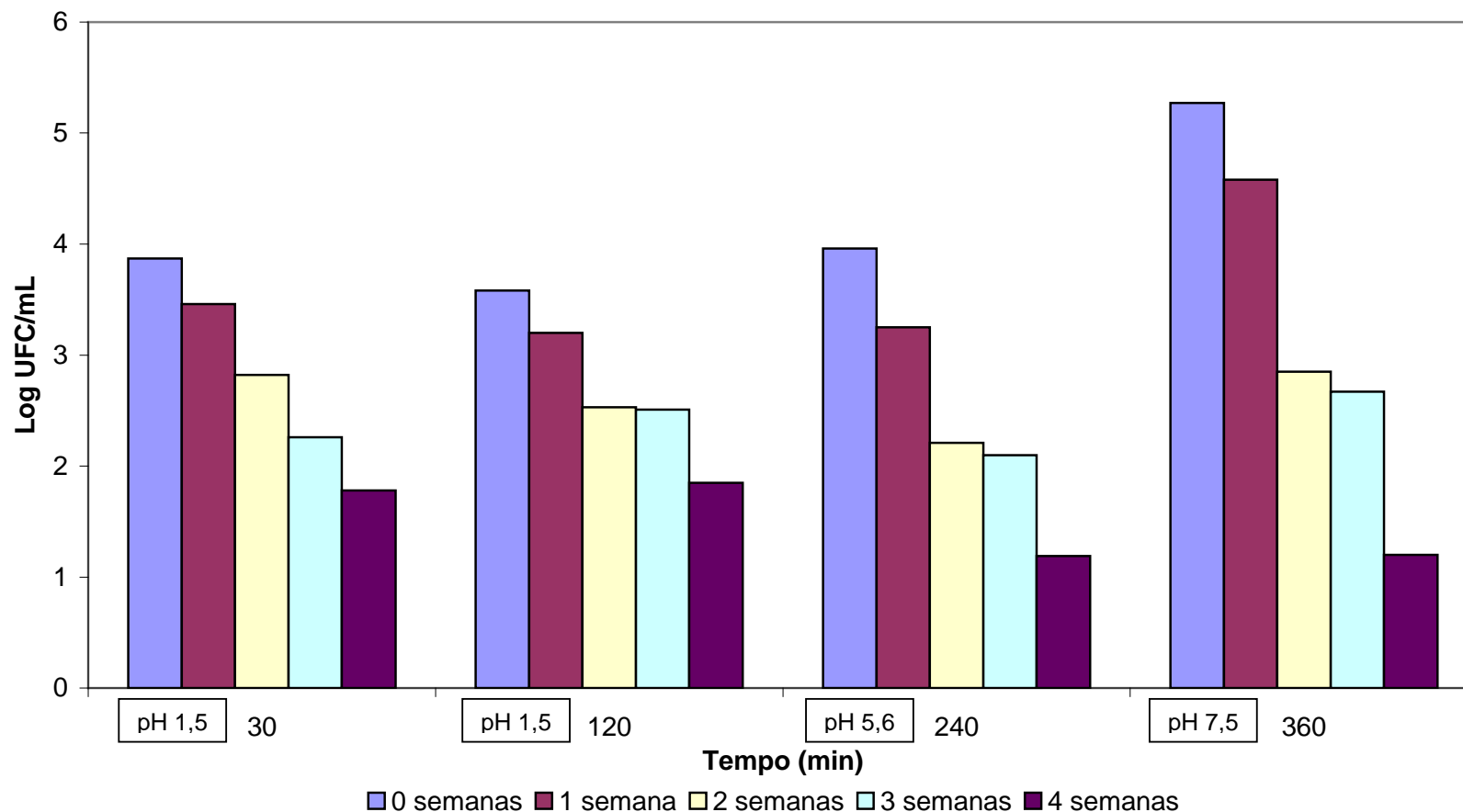


Figura 15. População de células de *B. lactis* (log UFC/mL) encapsuladas com alginato-quitosana em leite fermentado estocado por 0, 1, 2, 3 e 4 semanas sob refrigeração, após exposição a pH 1,5 com 30 e 120 min, posteriormente a pH 5,6 de 121 a 240 min e finalmente a pH 7,5 de 241 a 360 min (37°C, 150 rpm), simulando um tratamento com fluidos gastrintestinais com adição de enzimas e bile (pepsina e lipase no tampão pH 1,5 e pancreatina e bile nos tampões pH 5,6 e 7,5).

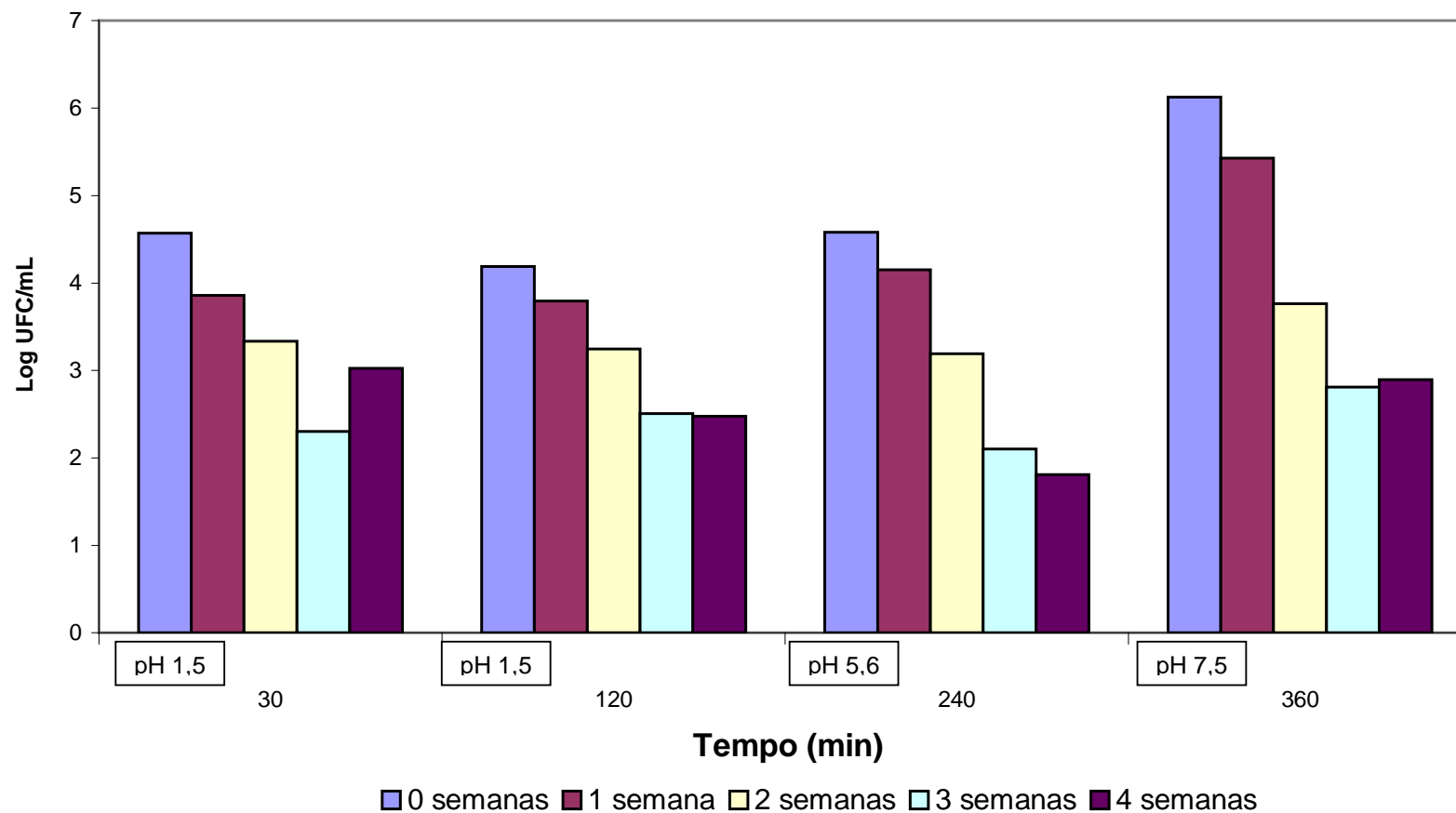


Figura 16. População de células de *B. lactis* (log UFC/mL) encapsuladas com alginato-quitosana-acryl-eze em leite fermentado estocado por 0, 1, 2, 3 e 4 semanas sob refrigeração, após exposição a pH 1,5 com 30 e 120 min, posteriormente a pH 5,6 de 121 a 240 min e finalmente a pH 7,5 de 241 a 360 min (37°C, 150 rpm), simulando um tratamento com fluidos gastrintestinais com adição de enzimas e bile (pepsina e lipase no tampão pH 1,5 e pancreatina e bile nos tampões pH 5,6 e 7,5).

5 Conclusões

Com os resultados obtidos, conclui-se que:

- A encapsulação de *B. lactis* em partículas produzidas com alginato e alginato-quitosana é viável tecnologicamente;
- As partículas de alginato de cálcio são completamente dissolvidas em pH 7,5. Por outro lado, partículas de alginato-quitosana não se dissolvem em pH 7,5, mas promovem liberação de células, o que demonstra funcionalidade entérica.
- A aplicação dos polímeros entéricos sureteric e/ou acryl-eze como aditivos em partículas de alginato-quitosana, na concentração de 0,1%, consistiu em uma inovação tecnológica e melhorou a funcionalidade entérica das partículas nos testes de simulação do trato gastrointestinal;
- Células não encapsuladas de *B. lactis*, quando submetidas a tratamento em soluções de suco gástrico simulado sem a adição de enzimas, foram rapidamente destruídas. Por outro lado, a presença de pepsina no suco gástrico proporcionou um efeito protetor às células aumentando a viabilidade da cultura em suco gástrico simulado;
- A encapsulação em alginato-quitosana-acryl-eze foi a mais eficiente para a recuperação de *B. lactis* após o tratamento em suco gástrico simulado, em comparação com as formulações alginato, alginato-quitosana e alginato-quitosana-sureteric;
- Os métodos utilizados para encapsulação de *B. lactis* não foram eficientes para promover proteção às células bacterianas em leites fermentados;
- A microencapsulação também não foi eficiente para proteger *B. lactis* em leite fermentado contra injúrias causadas por soluções simuladas do trato gastrointestinal;
- A presença de pepsina e/ou nutrientes (peptídeos e aminoácidos) na mistura suco gástrico-leite incentivou a multiplicação de *B. lactis*. A microencapsulação, por sua vez, inibiu o contato da bactéria com os nutrientes necessários para a sua multiplicação e, conseqüentemente, prejudicou a sua sobrevivência causando um efeito inverso ao esperado.

6 Referências

ADHIKARI, K.; MUSTAPHA, A.; GRÜN, I.U.; FERNANDO, L. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.83, p.1946-1951, 2000.

ADHIKARI, K.; MUSTAPHA, A.; GRÜN, I.U. Survival and metabolic activity of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in stirred yogurt. **J. Food Sci.**, Chicago, v.68, n.1, p.275-280, 2003.

BRASIL. Legislação. VisaLegis. Resolução ANVS/MS n.19, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/alimentos/comissoes/tecnologia.htm>. Acesso em: 30 jun. 2001.

CHAMPAGNE, C.P.; GAUDY, C.; PONCELET, D.; NEUFELD, R.J. *Lactococcus lactis* release from calcium alginate beads. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.58, p.1429-1434, 1992.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.84, p.759-768, 1998.

CONWAY, P.L.; GORBACH, S.L.; GOLDIN, B.R. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.70, p.1-12, 1987.

De acordo com NBR 6023 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 2004.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and Bifidobacteria. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.79, p.1529-1536, 1996.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.81, p.2804-2816, 1998.

GÄNZLE, G.G.; HERTEL, C.; VOSSEN, J.M.B.M.; HAMMES, W.P. Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of *Escherichia coli* and *Listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.48, p.21-35, 1999.

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. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.66, n.6, p.2605-2612, 2000.

GASERØD, O.; SANNES, A.; SKJAK-BRAEK, G. Microcapsules of alginate-chitosan. II. A study of capsule stability and permeability. **Biomaterials**, Amsterdam, v.20, p.773-783, 1999.

GILLILAND, S.E. Acidophilus milk products: a review of potential benefits to consumers. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.72, n.10, p.2483-2494, 1989.

GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 12.ed. São Paulo: Nobel, 1987. 467p.

GUARNER, F.; SCHAAF SMA, G.J. Probiotics. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.39, p.237-238, 1998.

GUERIN, D.; VUILLEMARD, J.C.; SUBIRADE, M. Protection of bifidobacteria encapsulated in polysaccharide-protein gel beads against gastric juice and bile. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.66, n.11, p.2076-2084, 2003.

GUYTON, A.C. Funções secretoras do tubo alimentar. In: _____. **Fisiologia humana e mecanismos das doenças**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p.413-423.

FANTAZZINI, L.; MAYER, M.D.B.; FRANCO, B.D.G.M. **Avaliação da resistência ao suco gástrico de lactobacilos em leites fermentados**. São Paulo: Laboratório de Microbiologia de Alimentos/Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, 2000. Trabalho não publicado.

FAVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. The effect of the immobilization of *L. acidophilus* & *B. lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. **Milchwissenschaft**, Kempten, v.55, n.9, p.496-499, 2000.

FAVARO-TRINDADE, C.S. **Encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* (La-05) e *Bifidobacterium lactis* (Bb-12) e avaliação *in vitro*, do nível de tolerância dos mesmos às secreções gastrintestinais**. Campinas, 2001. 137p. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas.

FAVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. **J. Microencapsulation**, Basingstoke, v.19, n.4, p.485-494, 2002.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.66, p.365-378, 1989.

HANSEN, L.T.; ALLAN-WOJTAS, P.M.; JIN, Y.L.; PAULSON, A.T. Survival of Calcium alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiol.**, Sidcup, v.19, p.35-45, 2002.

HARRIS, L.J.; DAESCHEL, M.A.; STILES, M.E.; KLAENHAMMER, T.R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.52, n.6, p.384-387, 1989.

HUGUET, M.L.; DELLACHERIE, E. Calcium alginate beads coated with chitosan: effect of the structure of encapsulated materials on their release. **Process Biochem.**, Barking, v.38, p.745-751, 1996.

HYNDMAN, C.L.; GROBOILLOT, A.F.; PONCELET, D.; CHAMPAGNE, C.P.; NEUFELD, R.J. Microencapsulation of *Lactococcus lactis* within cross-linked gelatin membranes. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, Bognor Regis, v.56, p.259-263, 1993.

ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S. Bifidobacteria: research and development in Japan. **Food Technol.**, Chicago, v.46, p.126-135, 1993.

IYER, C.; KAILASAPATHY, K. Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under *in vitro* acidic and bile salt conditions and in yogurt. **J. Food Sci.**, Chicago, v.70, n.1, p.M18-M23, 2005.

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-lisine microparticles. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.210, p.51-59, 2000.

KAILASAPATHY, K.; RYBKA, S. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.: their therapeutic potential and survival in yoghurt. **Aust. J. Dairy Technol.**, Melbourne, v.52, p.28-35, 1997.

KIM, S.; CHOI, J.; BALMACEDA, E.A.; RHA, C. Chitosan. In: KUHTREIBER, W.M.; LANZA, R.P.; CHICK, W.L.; CHANG, T.M.S., eds. **Cell encapsulation technology and therapeutics**. Boston: Birkhäuser, 1999. p.151-172.

KOS, B.; SUSKOVIC, J.; GORETA, J.; MATOSIC, S. Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. **Food Technol. Biotechnol.**, Zagreb, v.38, n.2, p.121-127, 2000.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.13, p.3-13, 2003.

LEE, K.; HEO, T. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.66, n.2, p.869-873, 2000.

LEE, K.Y.; PARK, W.H.; HA, W.S. Polyelectrolyte complexes of sodium alginate with chitosan or its derivatives for microcapsules. **J. Appl. Polym. Sci.**, New York, v.63, p.425-432, 1997.

LIAN, W.C.; HSIAO, H.C.; CHOU, C.C. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.86, p.293-301, 2003.

LIMA, K.G.C. **Otimização das condições de cultivo laboratorial de bactérias lácticas e probióticas e avaliação do comportamento de *Lactobacillus casei* no trato gastrointestinal através de modelos simulados *in vitro***. São Paulo, 2005. 93p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.12, p.173-182, 2002.

MCCOMAS Jr., K.A.; GILLILAND, S.E. Growth of probiotic and traditional yogurt cultures in milk supplemented with whey protein hydrolysate. **J. Food Sci.**, Chicago, v.68, n.6, p.2090-2095, 2003.

MRSNY, R.J. Site-specific drug delivery in the gastrointestinal tract. In: PARK, K, ed. **Controlled drug delivery**: challenges and strategies. Washington: American Chemical Society, 1997. p.107-123. (ACS Professional Reference Book).

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v.38, n.1, p.1-21, 2002.

O'RIORDAN, K.; ANDREWS, D.; BUCKLE, K.; CONWAY, P. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.91, p.1059-1066, 2001.

PONCELET, D.; PONCELET DE SMET, B.; BEAULIEU, C.; HUGUET, M.L.; FOURNIER, A.; NEUFELD, R.J. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. II. Physicochemistry. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Heidelberg, v.43, p.644-650, 1995.

REID, G. Minireview – the scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.65, n.9, p.3763-3766, 1999.

SALLANS, F.; RODRIGUEZ, F.; SABLAYROLLES, B.; COMBES, A.; PATAU, J.P.; ROUFFIAC, R. Étude comparative de cinq spécialités de théophylline a libération prolongée. **J. Pharm. Belg.**, Bruxelles, n.43, v.2, p.81-87, 1988.

- SANDERS, M.E. Probiotics. **Food Technol.**, Chicago, v.53, n.11, p.67-77, 1999.
- SANTOS, A.B.; FERREIRA, V.P.; GROSSO, C.R.F. Microcápsulas: uma alternativa viável. **Biotechnol. Cienc. Desenvolv.**, Brasília, v.3, n.16, p.26-30, 2000.
- SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.83, n.4, p.894-907, 2000.
- SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* ssp. in yoghurt. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.7, n.5, p.349-356, 1997.
- SHAH, N.P.; RAVULA, R.R. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. **Aust. J. Dairy Technol.**, Melbourne, v.55, n.3, p.139-144, 2000.
- SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J.K.V.; JEON, Y.J. Food applications of chitin and chitosans. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.10, p.37-51, 1999.
- SHEU, T.Y.; MARSHALL, R.T. Microentrapment of Lactobacilli in calcium alginate gels. **J. Food Sci.**, Chicago, v.54, n.3, p.557-561, 1993.
- SHIHATA, A.; SHAH, N.P. Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.10, p.401-408, 2000.
- SIUTA-CRUCÉ, P.; GOULET, J. Improving probiotic survival rates. **Food Technol.**, Chicago, v.55, n.10, p.36-42, 2001.

STORMO, K.E.; CRAWFORD, R.L. Preparation of encapsulated microbial cells for environmental applications. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.58, p.727-730, 1992.

SUGAWARA, S.; IMAI, T.; OTAGIRI, M. The controlled release of prednisolone using alginate gel. **Pharm. Res.**, Norwell, v.11, p.272-277, 1994.

SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N.; ARUMUGASWAMY, R.; PEIRIS, P.; KAILASAPATHY, K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.62, p.47-55, 2000.

SUN, W.; GRIFFITHS, M.W. Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.61, p.17-25, 2000.

VANDAMME, T.H.F.; LEONOURRY, A.; CHARRUEAU, C.; CHAUMEIL, J.C. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v.48, p.219-231, 2002.

YANG, H.; WRIGHT, J.R. Calcium alginate. In: KUHTREIBER, W.M.; LANZA, R.P.; CHICK, W.L.; CHANG, T.M.S., eds. **Cell encapsulation technology and therapeutics**. Boston: Birkhäuser, 1999. p.79-89.

ZAK, K.L. Physicochemical properties of opadry, sureteric and surelease. In: MCGINITY, J.W., ed. **Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1997. p.373-384. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.79).

ZHOU, Y.; MARTINS, E.; GROBOILLOT, A.; CHAMPAGNE, C.P.; NEUFELD, R.J. Spectrophotometric quantification of lactic bacteria in alginate and control of cell release with chitosan coating. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.84, p.342-348, 1998.

ZIMMERMANN, A.L.S. **Desenvolvimento e avaliação de micropartículas contendo microrganismos viáveis utilizados como bioinseticida**. São Paulo, 2001. 133p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.