

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA**

NADIÉGE DOURADO PAULY-SILVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE GOMA DE MASCAR
ANTICARIOGÊNICA CONTENDO PROBIÓTICO
MICROENCAPSULADO.**

**ARARAQUARA – SP
2013**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA**

**DESENVOLVIMENTO DE GOMA DE MASCAR
ANTICARIOGÊNICA CONTENDO PROBIÓTICO
MICROENCAPSULADO.**

NADIÉGE DOURADO PAULY-SILVEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição, área de Ciência dos Alimentos.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Elizeu Antonio Rossi
Co-ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Katia Sivieri**

**ARARAQUARA – SP
2013**

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

P333d Pauly-Silveira, Nadiége Dourado
Desenvolvimento de goma de mascar anticariogênica contendo probiótico
microencapsulado / Nadiége Dourado Pauly-Silveira . – Araraquara, 2013
136 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita
Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação
em Alimentos e Nutrição

Orientador: Elizeu Antonio Rossi

Coorientador: . Katia Sivieri.

1. Lactobacillus acidophilus. 2. Lactobacillus paracasei. 3. Goma de
mascar. 4. Microencapsulação. 5. Liofilização. I. Rossi, Elizeu Antonio,
orient. II. Savieri, Katia, coorient.. III. Título.

CAPES: 50700006

FOLHA DE APROVAÇÃO

NADIÉGE DOURADO PAULY-SILVEIRA

DESENVOLVIMENTO DE GOMA DE MASCAR ANTICARIOGÊNICA CONTENDO PROBIÓTICO MICROENCAPSULADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição, área de Ciência dos Alimentos.

Aprovação em: 19/04/2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Elizeu Antonio Rossi
Orientador – UNESP/Araraquara

Prof^a. Dr^a. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini
Membro - UNESP/Araraquara

Prof^a. Dr^a. Raquel Bedani
Membro – USP/São Paulo

Prof^a. Dr^a. Raquel Guttierres Gomes
Membro – UEM/Maringá

Prof^a. Dr^a. Adriane Elisabete Antunes de Moraes
Membro – UNICAMP/Limeira

Araraquara – SP
2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha avó Alice, que não está mais entre nós, que sempre me mostrou o melhor lado da vida com sua simplicidade, fé, carinho e alegria de viver. É com muitas saudades que dedico a você Vovó!

Aos meus pais Luís e Lúcia, eternos orientadores, e às minhas irmãs Melani e Mirele, pelo amor incondicional, por estarem sempre ao meu lado me apoiando e me encorajando. Pelo alicerce e pela base que deram à minha vida e pela oportunidade apesar de tantos sacrifícios. Sem vocês eu não teria chegado até aqui!

Ao meu esposo Mateus pela compreensão, pelo companheirismo, pela paciência, pelo amor e carinho de sempre, pela amizade e pelo suporte constantes. Eu não teria feito tudo o que fiz se não fosse o seu apoio e incentivo para enfrentar todos os meus desafios e alcançar os meus sonhos.

Ao meu avô Joaquim e ao meu tio Sinomar por acreditarem em mim, pelo carinho e pelo incentivo de sempre, à minha avó Terezinha pelo exemplo de mulher guerreira e batalhadora, ao meu cunhado Lucas, ao meu avô Olávio e a toda minha família pelo carinho e torcida constantes. Vocês trazem alegria à minha vida.

À família do meu esposo e também minha família, meu sogro e minha sogra, Ir. João e Ir^a. Joana, aos meus cunhados e ao meu sobrinho Miguel, pelo carinho e atenção de sempre, pelo apoio, pela credibilidade e por se tornarem parte da minha vida.

A todos que acreditam, superam suas limitações e com determinação realizam os seus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo privilégio de nascer num lar cristão, por ser uma luz constante aos meus pés, guiando meus caminhos, por ter me dado forças para alcançar mais uma vitória.

Aos meus pais, Luis e Lúcia, pelo amor incondicional, pela criação e dedicação, pelo exemplo de trabalho, humildade e honestidade, por tantos sacrifícios em meu favor, por sempre acreditarem em mim e em meus sonhos.

Às minhas queridas irmãs, Melaní e Mirele, pelo amor, pelos momentos de alegria e amizade, por me fazerem tão feliz e realizada como irmã, por darem sentido à minha vida.

Ao meu esposo Mateus, pelo amor e companheirismo, pelo apoio e compreensão, por estar sempre ao meu lado me incentivando em tudo, por ser um exemplo de esforço, dedicação e disciplina.

Aos meus avós Joaquim, Alice (*in memoriam*), Terezinha e Olávio, pelo amor dispensado, pelas orações, pelos conselhos. Ao Tio Sinomar pela força, pelo exemplo de determinação. A toda minha família pela torcida constante e por fazerem parte da minha vida.

À minha família “Bucci da Silveira” por todo amor, apoio e credibilidade a mim dispensados.

Ao Prof. Dr. Elizeu A. Rossi, por mais um voto de confiança em me orientar, pela dedicação, pelos ensinamentos, não só científicos e profissionais, mas pela contribuição para meu amadurecimento pessoal.

À Prof^a. Dr^a. Daniela C. U. Cavallini por acima de tudo ser minha grande amiga e incentivadora, pela oportunidade de trabalhar e aprender com você.

À minha eterna “sis” Mariana N. Roselino, por ter se transformado em uma grande amiga-irmã, por ter dividido comigo todos os momentos durante meu doutorado, sendo eles felizes ou não.

À Roseli, pelo carinho, pela paciência, pela constante ajuda e amizade.

À Larissa S. Celiberto, “LariCota”, pela linda amizade que se iniciou, pelo carinho e atenção.

À Tathiê P. Ignácio, pela imensa ajuda no desenvolvimento desse trabalho, sem a qual meus momentos de laboratório não seriam tão divertidos.

À Raquel Bedani, pela grande amizade que se mantém apesar da distância, pela confiança e incentivo de sempre.

À Livia C. Oliveira, pela participação em algumas etapas dessa pesquisa.

À Prof^a. Dr^a. Katia Sivieri pela Co-Orientação.

A toda família “LPP”, Josiane, Fernanda, Érica, Maria Thereza, Camilla, Ana Paula, Mariana Costa, Daniel, Gabriela e Dimitri, eternos amigos do Laboratório de Pesquisa em Probiótico, pelo trabalho em equipe, pelo aprendizado, pela amizade em todos os momentos.

Ao pessoal da UNISOJA, Antônio (Macarrão), Flávio e Celso pelo suporte durante os processamentos das gomas.

Ao Prof. Dr. Rubens Monti, pela consideração e amizade, e pela colaboração no início deste trabalho.

Aos professores, alunos e funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição, pela valiosa contribuição direta ou indireta para minha formação acadêmica.

À Seção de Pós-graduação da FCFAr, pela atenção e profissionalismo dispensados a mim ao longo do meu mestrado e doutorado.

A todos os funcionários da Biblioteca, da Administração e de toda Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela amizade construída desde 2002, pela atenção e ajuda.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite, pela relevante contribuição acadêmica e científica prestada a essa tese, pelas correções e sugestões.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo auxílio financeiro a essa pesquisa.

Passados mais de 4 anos desde o início desse trabalho, e 11 anos desde minha chegada a essa Instituição, muitas foram as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram para meu crescimento. A todas elas, meu muito obrigado.

*“Mais grato a Ti, ó bondoso Senhor,
Faz-me por Teu infinito poder;
O que fizeste em mim, por amor,
Homem nenhum poderia fazer.*

*Mais grato a Ti, mais grato a Ti,
De coração, ó Senhor, quero ser;
Celeste dádiva eu recebi,
Quero Teu nome, ó Deus, engrandecer.”*

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma nova goma de mascar, sem adição de carboidratos simples, contendo probiótico microencapsulado, de forma a garantir a viabilidade do mesmo durante o período de estocagem dessa goma em temperatura ambiente. Para isso, o presente estudo avaliou a viabilidade dos microrganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 e *Lactobacillus paracasei* CRL 75, em temperaturas ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) e de refrigeração ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), e em condições simuladas do trato gastrointestinal, nas formas livre e microencapsulada, seguidas ou não de liofilização, utilizando-se seis diferentes matrizes encapsulantes à base de alginato de sódio. Seis métodos de microencapsulação foram empregados, sendo cinco por extrusão (“A”, “B”, “C”, “D” e “E”) e um por emulsão (“F”). O método “D” continha o prebiótico inulina em sua composição e o método “E” foi posteriormente revestido por quitosana. As microencapsulações foram realizadas adicionando-se 20% de cultivo celular às soluções de alginato de sódio. As cápsulas foram acondicionadas em frascos estéreis, armazenadas em temperaturas ambiente e de refrigeração. As cápsulas liofilizadas foram mantidas em temperatura ambiente. A viabilidade do microrganismo *L. acidophilus* foi avaliada por um período de 126 dias em temperatura ambiente e 161 dias para as cápsulas refrigeradas e liofilizadas. O *L. paracasei* teve sua viabilidade acompanhada por 63 dias, em temperaturas ambiente e de refrigeração, e por 91 dias para as cápsulas liofilizadas. Os microrganismos livres e os encapsulados foram submetidos aos testes de sobrevivência às condições simuladas do trato gastrointestinal: em fluido gástrico simulado (FGS/120 min) e em fluido intestinal simulado (FIS/180 min). Os probióticos foram testados quanto à produção de substâncias antimicrobianas *in vitro* frente ao *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Duas gomas de mascar, sem adição de carboidratos, foram desenvolvidas utilizando o probiótico *L. acidophilus* (microrganismo escolhido para continuidade dos estudos devido aos melhores resultados de viabilidade celular) microencapsulado pelos métodos “B” (“a” – capítulo 4) e “F” (“b” – capítulo 4). Essas gomas foram avaliadas sensorialmente pelo teste de aceitação e tiveram a viabilidade do microrganismo testada semanalmente por 63 e 28 dias, respectivamente. A capacidade de liberação do probiótico das gomas de mascar foi avaliada através de análise microbiológica das salivas de cinco voluntários. Os resultados foram avaliados estatisticamente ($p < 0,05$). Verificou-se que o método de microencapsulação “E” mostrou-se eficiente na proteção do *L. acidophilus* em temperatura ambiente durante 119 dias, enquanto que refrigerado o método “F” foi o mais eficaz, mantendo o microrganismo viável por 154 dias. O método “B” seguido de liofilização foi capaz de manter a viabilidade também por 154 dias, em temperatura ambiente. Para o probiótico *L. paracasei*, em temperatura ambiente o método de microencapsulação “E” manteve a viabilidade do microrganismo por 56 dias, enquanto que refrigerado a técnica “D” manteve o microrganismo viável pelo mesmo período. As cápsulas obtidas pelo método “C” e liofilizadas mantiveram o microrganismo viável por 84 dias. As populações dos dois microrganismos livres submetidos ao FGS e ao FIS foram superiores às verificadas para os microrganismos microencapsulados para todos os métodos avaliados. No entanto, ambos apresentaram populações iniciais superiores (em torno de 9 e 10 \log_{10} UFC/g), havendo queda de 1 ciclo log quando os dois foram submetidos ao FGS. A comparação entre métodos evidenciou que a microencapsulação “E” conferiu maior resistência ao *L. acidophilus* frente ao FGS com manutenção da mesma ordem logarítmica da população inicial (em torno de 8 \log_{10} UFC/g). Quando ambos os microrganismos foram submetido ao FIS não houve redução da ordem de grandeza para nenhuma técnica e o método “F” demonstrou maior resistência para os probióticos. O teste de sobrevivência para o *L. paracasei* apontou

que os métodos “C”, “D” e “E” não apresentaram queda de ciclo log quando comparados às suas populações iniciais, sendo que o método “D” foi o que apresentou maior proteção frente ao FGS. O teste de produção de substâncias antimicrobianas mostrou inibição da multiplicação *in vitro* do *S. mutans* pelos dois probióticos em estudo, indicando que ambos são capazes de combater a bactéria cariogênica. O teste de aceitação apontou a goma de mascar “F” como sendo mais aceita estatisticamente para os atributos aparência, sabor, textura e impressão global. No entanto, a viabilidade do probiótico nas gomas de mascar se deu por mais tempo para a goma “B” (63 dias), contra 28 dias para a goma “F”. Os resultados do teste de liberação na boca do microrganismo probiótico das gomas de mascar mostraram que as salivas coletadas ao longo de 10 minutos de mastigação das gomas probióticas apresentaram populações de lactobacilos estatisticamente superiores às salivas coletadas no início do teste (controle). Esses resultados indicam que o microrganismo contido nas gomas de mascar aprisionado nas cápsulas foi liberado na boca, e dessa forma, pode exercer sua função como probiótico, visto que no teste *in vitro* ele foi capaz de inibir a multiplicação da bactéria patogênica da cavidade oral. De maneira geral, pode-se afirmar que o processo de microencapsulação de microrganismos probióticos traz vantagens quanto à proteção dos mesmos, principalmente quando associado à liofilização, mantendo-os viáveis em temperatura ambiente, abrindo, assim, a possibilidade de incorporação destas bactérias em alimentos que devam ser estocados nessa temperatura. Pode-se concluir que foi possível desenvolver uma goma de mascar com potencial anticariogênico, contendo probiótico microencapsulado capaz de sobreviver na goma e de ser liberado na boca.

Palavras-chave: *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014, *Lactobacillus paracasei* CRL 75, Goma de mascar, Microencapsulação, Liofilização.

Abstract

This study aimed to develop a new gum without addition of simple carbohydrates, containing microencapsulated probiotic to ensure the viability for this microorganism during the gum storage period at room temperature. For this, the present study evaluated the viability of the probiotics *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 and *Lactobacillus paracasei* CRL 75, at room ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) and refrigeration ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) temperatures, and in simulated gastrointestinal conditions, both free and microencapsulated forms, followed or not by freeze-drying, using six encapsulating matrices based on sodium alginate. Six microencapsulation methods were employed, five extrusion (“A”, “B”, “C”, “D”, and “E”) and one emulsion (“F”). The method “D” contained the prebiotic inulin in its composition and the method “E” was subsequently coated by chitosan solution. The microencapsulation methods were performed by adding 20% of cell culture to solutions of sodium alginate. The capsules were placed in sterile vials, stored at room and refrigeration temperatures. The freeze-dried capsules were kept at room temperature. The viability of the microorganism *L. acidophilus* was evaluated for a period of 126 days at room temperature and 161 days under refrigeration and for freeze-dried capsules. The viability of the microorganism *L. paracasei* was accompanied for 63 days at room temperature and under refrigeration, and for 91 days to the freeze-dried capsules. The free and microencapsulated microorganisms were submitted to survival test into simulated gastrointestinal conditions: in simulated gastric fluid (SGF/120 min) and simulated intestinal fluid (SIF/180 min). The probiotics were tested *in vitro* for antimicrobial substances production against the *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Two chewing gum without added carbohydrates were developed using the probiotic *L. acidophilus* (microorganism which was chosen to continue the studies due to better results of cell viability) microencapsulated by methods “B” (“a” – Chapter 4) and “F” (“b” – Chapter 4). These gums were evaluated by sensory acceptance test and had the viability of the microorganism weekly assessed for 63 and 28 days, respectively. The ability to release the probiotics of chewing gums was evaluated by microbiological analysis of five volunteers saliva. The results were evaluated statistically ($p < 0.05$). It was found that the method “E” was effective in protecting *L. acidophilus* at room temperature for 119 days, whereas under refrigeration the method “F” was the most effective, maintaining the microorganism viable for 154 days. The “B” method followed by freeze-drying was able to keep the viability for also 154 days at room temperature. For the *L. paracasei*, at room temperature the method “E” maintained the viability of this microorganism for 56 days, whereas, under refrigeration, the technique “D” kept the microorganism viable for the same period. The capsules obtained by the “C” method and freeze-dried conserved the probiotic viable for 84 days. The counts of both free microorganisms submitted to SGF and SIF showed higher viable cell counts than those ones observed for the microencapsulated microorganisms by all of the methods evaluated. However, they showed higher initial count (around $9\text{ log}_{10}\text{CFU/g}$), with reduction of 1 log cycle when both were submitted to SGF. The comparison between the techniques showed that the “E” method conferred greater resistance to *L. acidophilus* as opposed to the SGF with maintenance of the same logarithmic order of initial count (around $8\text{ log}_{10}\text{CFU/g}$). When both probiotics were submitted to SIF, no reduction of log cycle was detected for any technique and the “F” method provided larger resistance to the microorganisms. The survival test showed that, for the *L. paracasei*, the methods “C”, “D” and “E” did not present log cycle decline compared to their initial counts, and the “D” method conferred the greatest protection against the SGF. The test of antimicrobial substances production showed *in vitro* multiplication inhibition of *S. mutans* by the two probiotics in study, indicating that both are

capable of combating cariogenic bacteria. The acceptance test pointed that chewing gum “F” was the most statistically accepted for the attributes appearance, flavor, texture and overall impression. However, the viability of the probiotic microorganism in chewing gum took longer for the gum “B” (63 days) compared to 28 days for the gum “F”. The results of the release test of the chewing gum probiotics in the mouth showed that the saliva collected over 10 minutes of chewing the probiotic gums presented lactobacilli counts statistically higher than saliva collected at the beginning of the test (control). These results indicated that the microorganism contained in chewing gum trapped in the capsules was released in the mouth, and thus, it may exert its function as a probiotic, since in vitro test the probiotic was able to inhibit the multiplication of oral pathogenic bacteria. In general, it can be stated that the process of probiotic microencapsulation is an advantageous regarding protection to this microorganisms, especially when associated to freeze-drying method, keeping them viable at room temperature, thus opening the possibility of incorporating these bacteria in food that must be stored at this temperature. It can be concluded that it was possible to develop a chewing gum with anticariogenic potential, containing microencapsulated probiotic microorganism which can survive in the gum and be released in the mouth.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014, *Lactobacillus paracasei* CRL 75, Chewing gum, Microencapsulation, Freeze-drying.

Sumário

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15

CAPÍTULO 1

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
1.1 Biofilme dental.....	17
1.2 Microrganismos probióticos.....	20
1.3 Probióticos e a modulação do sistema imune.....	22
1.4 Probióticos e a saúde oral.....	24
1.5 Probióticos e o controle da cárie.....	27
1.6 Microencapsulação de microrganismos probióticos.....	32
1.7 Goma de mascar.....	39
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

CAPÍTULO 2

Artigo 1: Efeito da microencapsulação de <i>Lactobacillus acidophilus</i> CRL 1014 sobre sua viabilidade em diferentes temperaturas e em condições gastrointestinais simuladas.....	55
---	----

CAPÍTULO 3

Artigo 2: Avaliação da viabilidade de <i>Lactobacillus paracasei</i> CRL 75 microencapsulado frente a diferentes temperaturas e às condições simuladas do trato gastrointestinal.....	86
---	----

CAPÍTULO 4

Artigo 3: Desenvolvimento de goma de mascar anticariogênica contendo probiótico microencapsulado.....	112
---	-----

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A partir da década de oitenta, evidências científicas têm fortalecido a existência de relação entre a precariedade da saúde bucal e diversas doenças. Tem sido reconsiderado que a microbiota bucal representa uma ameaça à saúde, podendo atuar como foco de disseminação de microrganismos com efeitos patogênicos, podendo desencadear diversas doenças, tais como, doenças cardiovasculares (endocardite e aterosclerose), infecção de próteses articulares, controle metabólico do diabetes, doenças respiratórias, nascimento de prematuros, entre outros. A microbiota bucal e suas toxinas podem comprometer a saúde sistêmica, por meio da sua disseminação na corrente sanguínea (ELLIS et al., 2007; SCANNAPIECO; DASANAYAKE; CHUN, 2010).

O biofilme dental abriga bactérias cariogênicas como os *Streptococcus mutans*, *S. sanguis* e leveduras como a *Candida albicans*. Vários estudos sugerem que o potencial cariogênico dessa levedura está associado a sua capacidade acidogênica (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006; ROZEN; BACRACH; STEINBERG, 2004; STEINBERG; EYAL, 2004; TURK; ATES; SEN, 2008).

Dos microrganismos benéficos usados tradicionalmente na fermentação, os probióticos têm atraído a atenção de pesquisadores em todo o mundo, por estarem relacionados ao tratamento e prevenção da diarreia, à diminuição dos sintomas da intolerância à lactose, à redução do colesterol sérico, à modulação da resposta imune e à redução da incidência de tumores (BRUNSER; GOTTELAND, 2010; ROSSI et al., 2011; SAAD; BEDANI; MAMIZUKA, 2011; SIVIERI et al., 2008).

As infecções orais constituem algumas das mais comuns e onerosas formas de infecções em seres humanos. Nesse sentido, a bacterioterapia utilizando microrganismos probióticos surge como uma forma alternativa e promissora de combater infecções por microrganismos patogênicos (CILDIR et al., 2009; HAUKIOJA, 2010).

Embora os probióticos sejam administrados por via oral, os estudos sobre estes microrganismos com relação à saúde bucal são escassos e seus efeitos sobre a ecologia microbiana oral são ainda pouco conhecidos. Nos últimos anos, vários estudos clínicos têm demonstrado a existência de uma correlação positiva entre microrganismos probióticos e a

saúde bucal (GUPTA, 2011; HAUKIOJA, 2010; PHAM et al., 2009; STAMATOVA; MEURMAN, 2009).

Os microrganismos probióticos têm mostrado influência sobre a imunidade sistêmica através de vários mecanismos moleculares, promovendo o aumento da atividade macrofítica, o aumento do número de células T e interferon, o aumento na concentração de IgA, oferecendo assim uma evidente proteção contra agentes patogênicos (AURELI et al., 2011) e levando ao aumento da resistência às doenças infecciosas (TAKEDA et al., 2011), o que pode acarretar em melhora da saúde bucal. Saad, Bedani e Mamizuka (2011) chamam a atenção para o amplo alcance do efeito sobre o sistema imune mostrado pelas bactérias probióticas, que pode se dar devido ao aumento da função fagocitária, bem como ao aumento de neutrófilos, macrófagos e monócitos.

Tanto a manutenção quanto a viabilidade das culturas probióticas nos alimentos funcionais constituem grandes desafios tecnológicos para as indústrias que buscam sistemas que sejam capazes de proteger esses microrganismos das condições desfavoráveis do meio, durante o processamento, o armazenamento e a passagem pelo trato gastrointestinal após terem sido ingeridos (HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2012; KUANG; OLIVEIRA; CREAN, 2010). Nesse sentido, propostas de microencapsulação têm sido apresentadas por alguns pesquisadores e junto com elas vários métodos já foram avaliados com a finalidade de incorporar microrganismos probióticos em alimentos funcionais, fermentados ou não, como forma de proporcionar a eles uma maior estabilidade (FÁVARO-TRINDADE, 2011; HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2012; ISLAM et al., 2010).

As gomas de mascar podem ser utilizadas como veículos para agentes preventivos e/ou terapêuticos, com base nisso elas têm sido estudadas e utilizadas como veículos de uma gama de substâncias como cálcio, bicarbonato, clorexidina, flúor e polióis, como o xilitol, além de carrear substâncias medicinais como a nicotina, aspirina, anti-histamínicos, agentes antifúngicos, cafeína e vitaminas (LY; MILGROM; ROTHEN, 2008). Recentemente a goma de mascar tem sido utilizada como veículo para os microrganismos probióticos, para que sejam liberados na cavidade oral, onde possam exercer seus efeitos benéficos (ÇAGLAR et al., 2007; KELLER et al., 2012; TWETMAN et al., 2009).

Diante dos potenciais efeitos benéficos dos microrganismos probióticos na prevenção de diversas doenças, da escassez de produtos contendo probióticos voltados para um efeito na

microbiota oral, pareceu-nos oportuno buscar o desenvolvimento de uma nova goma de mascar isenta de carboidratos, contendo os microrganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 ou *Lactobacillus paracasei* CRL 75 microencapsulados, de forma a garantir a viabilidade dos mesmos durante o período de estocagem dessa goma em temperatura ambiente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma goma de mascar, sem adição de carboidrato simples (sacarose), contendo os microrganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 ou *Lactobacillus paracasei* CRL 75 microencapsulados, de forma a garantir a viabilidade dos mesmos durante o período de estocagem dessa goma em temperatura ambiente.

2.2 Objetivos específicos

-Definir condições para a microencapsulação das cepas probióticas *L. acidophilus* CRL 1014 e *L. paracasei* CRL 75, seguida ou não de secagem;

-Avaliar a estabilidade dos microrganismos microencapsulados, liofilizados e não liofilizados, durante o período de estocagem em temperatura ambiente e sob refrigeração;

- Desenvolver a goma de mascar probiótica;

- Determinar a estabilidade do cultivo probiótico microencapsulado na goma de mascar durante a sua estocagem em temperatura ambiente;

- Avaliar sensorialmente as gomas de mascar probióticas;

- Verificar a capacidade de liberação do microrganismo probiótico na boca a partir das gomas de mascar.

Capítulo 1

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Biofilme dental

A cavidade oral é um habitat bastante complexo, proporcionando o estabelecimento de uma grande diversidade de espécies microbianas (FAVERI et al., 2006). Estima-se que mais de 1000 espécies de bactérias estão presentes neste local (KEIJSER et al., 2008).

As bactérias residem na boca, tanto em seu estado planctônico (estado em que as células estão sozinhas) ou finamente integradas ao biofilme oral em várias superfícies. Os biofilmes orais estão em constante mudança e desenvolvem um aumento de estruturas complexas conforme “amadurecem”. A interação entre as espécies são características em biofilmes. Algumas espécies podem depender de outras para prover o ambiente adequado para a colonização. Além disso, as bactérias nos biofilmes diferem fisiologicamente daquelas em seu estado planctônico e tendem a ser mais resistentes aos fatores ambientais e aos agentes antimicrobianos. Tem sido estabelecido que alguns genes tornam-se ativos quando bactérias planctônicas se ligam às superfícies e crescem em biofilmes (RUDNEY, 2000; STAMATOVA; MEURMAN, 2009).

A saliva é o meio essencial que contribui para a diversidade microbiana na boca, com um papel importante na propagação do biofilme oral. O fluxo salivar pode levar ao desprendimento de alguns microrganismos das superfícies do biofilme e com isso modular a colonização microbiana. Além disso, sendo um meio complexo, a saliva contém diferentes proteínas com atividade bactericida, bacteriostática ou inibitória que coletivamente pode prejudicar uma variedade de espécies no estado planctônico (GRÖSCHL et al., 2009).

A colonização da cavidade oral é altamente específica e envolve um processo de interação físico-química entre as superfícies microbianas e os receptores tissulares do hospedeiro, o que explica a especificidade dos microrganismos aos diferentes sítios do corpo humano. Um microrganismo aderido aos tecidos epiteliais pode fornecer o sítio para a ligação de outra espécie, contribuindo para a manutenção de uma microbiota abundante e diversificada (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Em geral o processo de colonização microbiana oral é complexo e o microrganismo necessita se adaptar ao meio existente, aderir-se a superfícies, multiplicar-se e não estimular os mecanismos de defesa. Além disso, pode haver interação eletrostática específica e/ou não específica entre as células microbianas de mesma espécie e o substrato, e agregação entre espécies microbianas diferentes, formando, então, o biofilme (AN et al., 2001; DONLAN; COSTERTON, 2002; REMIS; COSTERTON; AUER, 2010; STEINBERG; EYAL, 2004; TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

A microbiota oral coexiste harmonicamente com o hospedeiro, mantendo uma homeostasia microbiológica que, por diversos fatores, pode se tornar patogênica, prejudicando a saúde do hospedeiro. A composição desta microbiota, além de ser diversificada e complexa, depende do pH, do potencial de oxirredução, da disponibilidade de nutrientes e água, da anatomia das estruturas bucais, do fluxo salivar e das substâncias antimicrobianas presentes na saliva (HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2005).

O biofilme pode ser formado em qualquer ambiente ou superfície em um meio fluido, como, por exemplo, na cavidade bucal em implantes dentais, dentes, aparelhos ortodônticos ou em materiais restauradores. Tais materiais, quando cobertos com o biofilme da cavidade bucal podem servir como um reservatório de microrganismos (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006; ROZEN; BACRACH; STEINBERG, 2004; STEINBERG; EYAL, 2004).

As comunidades microbianas que se formam nas superfícies dos dentes são compostas por múltiplas espécies que existem como uma rede de interações interespecies célula-a-célula. No início da colonização o fluxo salivar banha as superfícies e fixa as células suspensas na saliva sobre essas. Um mecanismo altamente seletivo de coagregação entre espécies está envolvido no desenvolvimento das comunidades multiespecies. Os colonizadores primários são os estreptococos e algumas espécies de *Actinomyces* spp., que precocemente coagregam com as veillonellas (KOLENBRANDER et al., 2006; KOLENBRANDER, 2011).

Acompanhando as reações de coagregação estão as interações metabólicas interespecies, a sinalização de pequenas moléculas entre as espécies e a multiplicação celular. Todas essas propriedades do desenvolvimento do biofilme são significativas e contribuem para o acúmulo da placa dentária (KOLENBRANDER, 2011).

Os primeiros estudos sobre a capacidade das bactérias orais de se multiplicarem na saliva como única fonte de nutrientes mostraram que uma espécie de *Actinomyces* spp. pôde

multiplicar-se, mas que três espécies de estreptococos não conseguiram se desenvolver na saliva (KOLENBRANDER, 2011). Palmer et al. (2001) reportaram que *Streptococcus gordonii* DL1 poderia multiplicar na saliva, mas que *S. oralis* 34 e *Actinomyces oris* T14 não poderiam, no entanto, essas duas espécies juntas apresentaram multiplicação abundante, indicando uma relação mutualística.

Os estreptococos produzem quantidades significativas de ácido láctico, e as veillonellas utilizam esse ácido como fonte de carbono e energia. Segundo Chalmers, Chen e Hughes (2011) essa conexão metabólica tem sido discutida e expandida e pode ser a força motriz para o desenvolvimento de comunidades multiespécies e para a transição de colonizadores primários para promotores das colonizações secundárias e intermediárias.

As interações interespécies ilustram possíveis vias de influência de cada espécie para o desenvolvimento do biofilme. Os colonizadores primários, como algumas espécies de estreptococos e *Actinomyces* spp. parecem interagir produtivamente com os colonizadores secundários, como a *Veillonella* spp. Os colonizadores primários não se multiplicam em pares uns com os outros, enquanto que os secundários parecem ter uma ampla gama que inclui emparelhamentos com colonizadores primários, intermediários e tardios (KOLENBRANDER, 2011).

Os colonizadores intermediários também exibem uma grande variedade de interações de pares, o que torna a comunidade multiespécies mais produtiva. As novas comunidades parecem se beneficiar da produção de ácido láctico por estreptococos e o consumo desse ácido pelas veillonellas. Os colonizadores tardios interagem bem com muitas espécies pertencentes a etapas anteriores de colonização, o que dá suporte a ideia de colonização sequencial (KOLENBRANDER, 2011).

1.2 Microrganismos probióticos

Nas últimas décadas a busca por alimentos funcionais aumentou consideravelmente, uma vez que os alimentos passaram a ser vistos não somente como uma fonte de nutrientes, mas também como promotores de bem-estar e saúde, devido à redução do risco de doenças

(SIRÓ et al., 2008). Dentro deste contexto, os probióticos têm sido amplamente estudados para sua aplicação em alimentos, devido a inúmeras atribuições em relação aos seus benefícios à saúde.

Os probióticos são descritos como sendo “microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001).

Os benefícios à saúde atribuídos à ingestão dos probióticos têm sido evidenciados em inúmeros estudos para sua aplicação em humanos, como no tratamento e prevenção da diarreia, na diminuição dos sintomas da intolerância à lactose, redução dos níveis de colesterol, modulação do sistema imune, alívio da constipação, aumento da absorção de minerais, efeitos antimutagênicos, anticarcinogênicos e antihipertensivos e produção de vitamina B (CUMMINGS, 2009; PERCIVAL, 2008; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Um microrganismo probiótico deve necessariamente sobreviver às condições ácidas do estômago, resistir à bile e às enzimas pancreáticas, colonizar o intestino por meio da adesão ao epitélio intestinal, mesmo que temporariamente, produzir substâncias antimicrobianas impedindo, dessa forma, o desenvolvimento de patógenos e realçando a imunidade inata, além disso, não deve possuir capacidade de translocação, genes de virulência e resistência a antibióticos (BRUNSER; GOTTELAND, 2010).

Diversos microrganismos podem ser considerados potencialmente probióticos, sendo aplicadas comercialmente diversas espécies de bactérias ácido-lácticas, como *Lactobacillus* spp., além de cepas do gênero *Bifidobacterium* spp. (O’SULLIVAN, 2006; VASILJEVIC; SHAH, 2008). A principal razão para esta escolha é o fato destes gêneros serem habitantes predominantes do intestino humano, sendo *Bifidobacterium* spp. do intestino grosso e *Lactobacillus* spp. do intestino delgado. Esses microrganismos inibem a proliferação de organismos patogênicos através da produção de ácidos orgânicos e bacteriocinas (BRUNSER; GOTTELAND, 2010).

O gênero *Lactobacillus* spp. contém grande número de espécies com propriedades bioquímicas e fisiológicas variadas, capazes de se multiplicarem em temperaturas que variam de 2 °C a 53 °C, com valores ótimos, geralmente, de 30 a 40 °C, e pH ótimo entre 5,5 e 6,2. Destes microrganismos, o *L. acidophilus* é um dos mais utilizados e estudados como probiótico nos últimos anos. Algumas cepas de *L. acidophilus* podem melhorar o valor

nutricional dos produtos aos quais forem adicionados por serem capazes de sintetizar ácido fólico, niacina, riboflavina e vitamina K (O'SULLIVAN, 2006).

Para garantir um efeito contínuo, os probióticos devem ser ingeridos diariamente. Mudanças positivas na composição da microbiota intestinal foram observadas com doses de 100 g de produto contendo 10^7 UFC/g de microrganismos probióticos (10^9 UFC por porção de produto), geralmente com a administração durante o período de 15 dias. Dessa forma, para apresentarem importância fisiológica ao consumidor, os probióticos devem atingir populações entre 10^8 e 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para consumo, conforme indicação do fabricante (ANVISA, 2008; SAAD, 2006).

A seleção de alimentos adequados para a administração desses microrganismos é um fator fundamental que deve ser considerado para o desenvolvimento de novos produtos probióticos. Anteriormente, a veiculação desses microrganismos era realizada preferencialmente através de produtos lácteos, no entanto, atualmente, há uma tendência crescente de desenvolvimento de novos produtos, como por exemplo, produtos à base de soja. Também se observa a disponibilização dos probióticos em cápsulas e microcápsulas, possibilitando novas formas de apresentação dos mesmos, apesar de excluir o potencial efeito sinérgico com o alimento (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

Na produção de alimentos contendo microrganismos probióticos deve-se fazer uma seleção adequada de cepas que mantenham sua viabilidade durante o processamento e o armazenamento, que sobrevivam à passagem pelo trato gastrointestinal e confirmem propriedades tecnológicas adequadas a esse produto (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

1.3 Probióticos e a modulação do sistema imune

A capacidade de inibição *in vitro* da multiplicação de outras bactérias por cepas de *Lactobacillus acidophilus* é verificada desde os anos 50 e tal observação vem sendo confirmada em muitos estudos desde então. Esta atividade antibacteriana dos lactobacilos pode ser explicada devido à produção de bacteriocinas de baixo peso molecular com uma atividade inibitória contra uma ampla gama de espécies microbianas, incluindo os

estreptococos orais (BRUNSER; GOTTELAND, 2010; TWETMAN; STECKSÉN-BLICKS, 2008).

Além disso, os probióticos também atuam positivamente sobre a imunidade, tanto sistêmica quanto local, do hospedeiro, caracterizando-se como outro possível mecanismo de ação no combate aos microrganismos patogênicos (AURELI et al., 2011; TAKEDA et al., 2011).

O probiótico *L. casei* foi capaz de induzir uma resposta celular tipo 1 em camundongos gnotobióticos, aumentando a produção *in vitro* de IL-12 por células peritoneais e de IFN- γ por células esplênicas. A administração deste probiótico a camundongos protegeu os mesmos contra patógenos intestinais, devido ao aumento da capacidade fagocítica dos macrófagos peritoneais, da atividade das enzimas envolvidas na fagocitose, da atividade das células *natural killer*, da produção de fator citotóxico pelas células de Kupfer e macrófagos peritoneais, e da secreção de IgA no lúmen intestinal (GALDEANO; PERDIGÓN, 2006).

Um estudo *in vivo* realizado por Médici et al. (2006) apontou a cepa *Lactobacillus paracasei* CRL 75 como sendo uma bactéria láctica com bom perfil probiótico, além de não ter documentado nenhuma ocorrência de bacteremia por translocação. O estudo evidenciou aumento de 50 a 70% de resposta imune sistêmica, pelo incremento da porcentagem de fagocitose por macrófagos peritoneais, além da estimulação da resposta imune local, apresentando uma elevação significativa no número de células produtoras de IgA no intestino delgado.

Molina et al. (2006) ao selecionarem bactérias lácticas probióticas para a utilização em produtos derivados de soja, verificaram que o *L. paracasei* CRL 75 apresentou maior eficiência probiótica, quando comparado a outras cepas, também probióticas, como o *L. paracasei* CRL 66 e o *L. reuteri* CRL 1098, considerando tanto a resposta imune sistêmica (com o aumento da porcentagem de macrófagos peritoneais), quanto a local no intestino delgado, pela estimulação de células produtoras de IgA. Nenhuma das cepas apresentaram efeitos colaterais indesejáveis como translocação microbiana, nem tampouco aumento significativo de células produtoras de IgG.

Outro lactobacilo, *L. casei* Shirota, estimulou a resposta imune celular aumentando as concentrações de IFN- γ , TNF- α e IL- 12, provocando uma redução nos títulos de vírus da

influenza no trato respiratório quando administrada por via nasal e oral (YASUI; KIYOSHIMA; HORI, 2004).

As células epiteliais desempenham um importante papel na defesa inata contra microrganismos através da produção de moléculas antimicrobianas, como as citocinas e as quimiocinas, necessárias para o recrutamento de leucócitos. Estudo de Stamatova e Meurman (2009) mostrou que o contato dos microrganismos probióticos com o epitélio oral induz a secreção de IL-8 e TNF- α .

Ao estudar o efeito de uma goma de mascar probiótica contendo *Lactobacillus reuteri*, Twetman et al. (2009) observaram a redução de citocinas pró-inflamatórias no fluido crevicular gengival, que pode ser o princípio do combate às inflamações da cavidade oral.

Essa influência sobre o sistema imune, mostrada por cepas de *Lactobacillus* spp., pode oferecer proteção contra os agentes patogênicos da microbiota bucal, bem como levar ao aumento da resistência às infecções orais, em decorrência tanto do aumento da função fagocitária quanto da produção de imunoglobulinas e citocinas.

Em síntese, existem evidências de sistemas *in vitro*, modelos animais e humanos que sugerem que os probióticos podem aumentar tanto a resposta imune específica quando a não específica, possivelmente pela ativação de macrófagos, aumento nos níveis de citocinas, aumento da atividade das células *natural killer* e/ou aumento nos níveis de imunoglobulinas. Apesar do limitado número de testes em humanos, esses resultados podem ser particularmente importantes para os idosos, que se beneficiariam de uma resposta imune melhorada. Os efeitos dos probióticos sobre o sistema imune incluem melhorar a resposta imune específica e não específica, inibindo a proliferação e a translocação de patógenos, e reduzindo a chance de infecções por patógenos comuns (SINGH et al., 2011).

1.4 Probióticos e a saúde oral

As espécies probióticas pertencem predominantemente aos gêneros *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. e é de grande interesse descobrir se tais microrganismos com

propriedades benéficas habitam naturalmente a cavidade oral e se possuem atividade cariogênica ou anticariogênica (STAMATOVA; MEURMAN, 2009).

Uma descoberta promissora foi a de que a população oral de lactobacilos diferia em indivíduos saudáveis e com doença periodontal. Kõll-Klais et al. (2005) observaram que pessoas saudáveis eram povoadas por *L. gasseri* e *L. fermentum*, enquanto que a espécie predominante em pacientes com periodontite era o *L. plantarum*, sendo que as duas primeiras espécies eram indetectáveis nessas condições.

Considerando a cavidade oral como a principal entrada do trato gastrointestinal, os probióticos ingeridos são expostos primeiramente à saliva que tem o papel de mediador de contato com os tecidos orais, duros e moles. Durante essa primeira etapa de contato, sobreviver e resistir aos fatores ambientais da boca são de suma importância. Proteínas salivares como lisozima, lactoferrina, histatina, peroxidase salivar, cistatinas e IgA secretora podem coletivamente afetar a viabilidade ou a morfologia da superfície celular de espécies probióticas e, além disso, afetar a adesão e suas atividades metabólicas. O papel da saliva no estabelecimento microbiano pode ser contraditório, inibindo a colonização (pela inibição da multiplicação ou prevenção da adesão aos tecidos) e, promovendo a colonização (BOSCH et al., 2003; STAMATOVA; MEURMAN, 2009).

Estudos *in vitro* testando a sobrevivência dos probióticos na saliva mostraram que cepas de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. não conseguiram se multiplicar na saliva, mas permaneceram viáveis após 24 horas de incubação. Observou-se que a lisozima reduziu significativamente a adesão de *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* Lc705 e *L. casei* Shirota. No entanto, as propriedades de adesão de *L. johnsonii* La1 e *B. lactis* BB12 não foram afetadas. Esses resultados enfatizam que a resposta cepa-específica às enzimas proteolíticas tem que ser considerada no momento da seleção de probióticos para a cavidade oral (HAUKIOJA; LOIMARANTA; TENOVUO, HAUKIOJA; SÖDERLING, TENOVUO, 2008).

Dentre os vários critérios de seleção, a adesão pode ser considerada como de importância primordial para promover a atividade probiótica. A capacidade dos probióticos de aderirem às superfícies da cavidade oral pode evitar ou pelo menos reduzir sua rápida exclusão desse ambiente (STAMATOVA et al., 2009).

A ligação interespecies é outra característica que afeta a composição e a estabilidade da microbiota em biofilmes orais. Tem sido estimado que o papel benéfico dos probióticos se

deva principalmente ao seu efeito inibitório sobre os agentes patogênicos. Essa atividade pode ser devido à competição por sítios de ligação com patógenos ou à produção de substâncias antimicrobianas. Os probióticos produzem ácido láctico, peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos, diacetil, substâncias antimicrobianas de baixo peso molecular, bacteriocinas e inibidores de adesão que podem inibir a multiplicação de uma ampla gama de patógenos. Bactérias ácido-láticas produtoras de substâncias antimicrobianas e que possuem a capacidade de agregar com patógenos pode constituir um importante mecanismo de defesa contra infecções (COLLADO; MERILUOTO; SALMINEN, 2007; MEURMAN, 2005).

Inúmeros trabalhos mostraram que o probiótico *Lactobacillus* spp. tem apresentado diversas atividades inibitórias *in vitro* contra diferentes patógenos orais (KELLER et al., 2011; KÖLL-KLAIS et al., 2005; MADHWANI; McBAIN, 2011; STAMATOVA; MEURMAN, 2009).

Estudos clínicos também têm sugerido que microrganismos probióticos podem exercer efeitos benéficos sobre a microbiota oral (HAUKIOJA, 2010; TWETMAN; STECKSEN-BLICKS, 2008). Pham et al. (2009) verificaram que o probiótico *Lactobacillus salivarius* W24 foi capaz de se estabelecer na microbiota oral, além de afetar a estabilidade da composição microbiana do biofilme derivado da saliva de diferentes indivíduos e de reduzir o pH dessa microbiota.

Deve-se notar que a maioria dos produtos contendo probióticos são produtos lácteos, e dessa forma são ricos em cálcio, que possivelmente auxilia na redução da desmineralização dos dentes causada pelo ataque ácido ao tecido dentário. Os probióticos devem aderir aos tecidos orais e se estabelecer para exercer um efeito cariostático e fazer parte do biofilme para combater os microrganismos cariogênicos (SINGH et al., 2011).

Outro efeito dos probióticos sobre a saúde oral foi estudado por Krasse et al. (2006) que verificaram que a ingestão do probiótico *Lactobacillus reuteri* na dose de 10^8 UFC/g ou mL, por 14 dias ininterruptos, foi eficaz na redução da gengivite e da placa bacteriana em pacientes com gengivite moderada a severa.

Segundo Meurman (2005) espécies de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. podem exercer efeitos benéficos na cavidade oral pela inibição tanto de espécies de *Streptococcus* spp. cariogênicos quanto de *Candida* spp. Nesse sentido, o uso de probióticos no controle da infecção por *Candida* spp. em pacientes idosos tem sido importante, uma vez

que esses pacientes são mais predispostos a adquirir essa infecção devido às doenças crônicas, ao uso de medicamentos, à precária higiene oral, à redução do fluxo salivar e à resposta imune debilitada. Microrganismos probióticos como *L. lactis*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, *L. rhamnosis* LC 705 utilizados em dois estudos mostraram redução significativa de infecção por cândida (HATAKKA et al., 2007; SIGNH et al., 2011). Esses mesmos autores sugerem que existem evidências de que o uso de probióticos pode reduzir o risco de hipossalivação e sensação de boca seca.

Nikawa et al. (2005) observaram uma coagregação de *C. albicans* associada às bactérias bucais *S. mutans* e *S. sanguis* em meio contendo glicose, e com *S. salivarius* e *Actinomyces* spp. em meio contendo galactose. Esta coagregação de *C. albicans* com bactérias da microbiota oral pode ser considerada um fator de importância na ecologia de biofilmes dentais, e a presença de açúcares alterando a coagregação da levedura pode contribuir para sua sobrevivência e manutenção nas diferentes superfícies do meio bucal (MORALES; HOGAN, 2010).

Lactobacillus reuteri e *L. brevis* estão entre as espécies capazes de afetar a gengivite e a periodontite (RICCIA et al., 2007). De acordo com Köll-Klais et al. (2005), altos níveis de lactobacilos na microbiota causa uma inibição da multiplicação de 82% de *Porphyromonas gingivalis* e de 65% de *Prevotella intermedia*, que são bactérias patogênicas presentes em pacientes com periodontite. Nesse estudo a prevalência de lactobacilos, particularmente *L. gasseri* e *L. fermentum*, na cavidade oral foi maior entre os participantes saudáveis do que dentre os pacientes com periodontite crônica.

1.5 Probióticos e o controle da cárie

A cárie dental é uma das doenças crônicas mais prevalentes na população mundial, caracterizando-se como a principal doença bucal. Tem origem bacteriana, podendo ser definida como uma doença de natureza infectocontagiosa e multifatorial que ocorre por interação de uma série de fatores essenciais para sua iniciação e progressão, resultando na perda localizada de minerais dos dentes afetados (BONIFAIT; CHANDAD; GRENIER, 2009). Tais fatores podem ser representados por uma dieta rica em carboidratos

fermentescíveis que servem de substrato para os microrganismos cariogênicos produzirem ácidos, principalmente o lático, que atuarão na superfície dentária, com maior ou menor intensidade, dependendo da susceptibilidade do hospedeiro em questão, levando à desmineralização dos tecidos dentais (BONIFAIT; CHANDAD; GRENIER, 2009; LEMOS; BURNE, 2008; LEMOS et al., 2010; TAKAHASHI; NYVAD, 2008).

De acordo com Marsh (2010), o início e a progressão da cárie dental estão sujeitos a um grande número de mecanismos de controle presentes na boca, que poderiam ser os fatores salivares, ou seja, pH salivar, capacidade tampão, concentração de ureia, níveis de cálcio e enzimas tais como amilase e lisozima, dependentes da saúde geral do indivíduo. Dessa forma, testes de capacidade tampão e mensuração do fluxo salivar também são utilizados para avaliar a atividade de cárie (MARSH, 2009).

A avaliação microbiológica em sítios de cáries ativas e em estudos com animais apontaram o *Streptococcus mutans* como sendo o agente causador primário de cáries dentárias no homem. A virulência do *S. mutans* reside em três atributos: sua habilidade em formar biofilmes na superfície dos dentes, produzir grandes quantidades de ácidos orgânicos (acidogenicidade) a partir de uma ampla variedade de carboidratos, além de sua tolerância ao estresse do ambiente, particularmente baixo pH (aciduricidade). Soma-se a isso a capacidade de produzir altas quantidades de polissacarídeos intra e extracelulares e polímeros para facilitar a aderência à superfície dentária (BOWEN; KOO, 2011; LEMOS; BURNE, 2008; TAKAHASHI; NYVAD, 2008).

Um estudo avaliando estomatites bucais em portadores de próteses em acrílico verificou a adesão de *Candida albicans* e *S. mutans* em superfícies acrílicas incubando os microrganismos em meios contendo glicose e sacarose e concluíram que na presença de sacarose o *S. mutans* aderiu fortemente à superfície em estudo. Uma firme adesão de *C. albicans* foi observada quando a levedura foi incubada simultaneamente com *S. mutans* na presença de sacarose, provavelmente devido aos polímeros extracelulares produzidos pela bactéria (HATAKKA et al., 2007; MORALES; HOGAN, 2010).

O *Streptococcus mutans* é o principal causador do desenvolvimento da cárie por causa da sua habilidade de produzir glucanas altamente ramificadas e insolúveis em água, o que facilita seu estabelecimento no biofilme oral (BEIGHTON, 2005). Sua propriedade acidogênica e seu rápido metabolismo da sacarose, frutose e glicose leva à diminuição do pH

que modifica a homeostase da comunidade microbiana oral com predomínio de bactérias que induzem a cárie (HEDBERG et al., 2008). Além disso, uma população salivar elevada de *S. mutans* na saliva está associada com o alto risco de iniciação e progressão da cárie (STAMATOVA; MEURMAN, 2009).

Considerando o papel essencial do *S. mutans* no desenvolvimento da cárie, vários esforços têm sido realizados para interferir na sua prevalência na boca e suas propriedades cariogênicas. Vários estudos clínicos têm sido executados com a administração de probióticos para reduzir o *S. mutans* na cavidade oral. Os estudos foram conduzidos depois que estudos *in vitro* mostraram que cepas probióticas suprimiam a proliferação de *S. mutans* e outros estreptococos orais com potencial cariogênico (KANG; NA; OH, 2005; MEURMAN et al., 1995; STAMATOVA; KARI; MEURMAN, 2007).

O primeiro estudo clínico examinou o efeito de leite contendo *L. rhamnosus* GG em crianças com cárie e risco de cárie. O estudo incluiu 594 crianças de 1 a 6 anos de idade que consumiram leite com e sem o probiótico por sete meses (NÄSE et al., 2001). O leite contendo o probiótico foi capaz de reduzir a população de *Streptococcus mutans* ao final do ensaio e uma redução significativa do risco de cárie também foi observada.

O suposto efeito profilático da cárie pelos probióticos também foi confirmado pela ingestão diária de queijo contendo *L. rhamnosus* GG e *L. rhamnosus* LC 705 (AHOLA et al., 2002). Apesar da curta duração (3 semanas) e do pequeno número de participantes nesse estudo (74 indivíduos entre 18 e 35 anos), o queijo probiótico reduziu significativamente a população de *S. mutans* no grupo de intervenção durante o período pós-tratamento quando comparado ao controle.

Outra espécie de microrganismo probiótico, *Bifidobacterium animalis* DN-173 010, ingerido diariamente em um iogurte demonstrou uma redução significativa de *S. mutans* salivar, enquanto que não houve redução significativa no nível de lactobacilos (ÇAGLAR et al.; ÇAGLAR; KARGUL; TANBOGA, 2005). Um estudo semelhante realizado por Petti, Tarsitani e D'Arca (2008) também mostrou que um iogurte contendo microrganismos probióticos apresentou atividade antibacteriana, *in vitro*, contra o *Streptococcus mutans*, e sugeriu que o decréscimo *in vivo* dos níveis de *S. mutans*, como resultado do consumo diário do iogurte, pode ter sido em decorrência da presença dos microrganismos vivos e, possivelmente, da liberação de bacteriocinas.

Os sorvetes também podem ser empregados como veículo atrativo para a ingestão de probióticos combinando promoção da saúde e prazer. Um sorvete contendo *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, se consumido por 10 dias, pode levar a uma redução significativa nos níveis orais de *S. mutans* (ÇAGLAR et al., 2008).

Na maioria dos estudos o probiótico é administrado em produtos lácteos fermentados. O meio de administração pode afetar positivamente os efeitos observados relacionados à redução de *S. mutans*. Para avaliar o papel de outros veículos de probióticos, Çaglar et al. (2006, 2008) administraram *L. reuteri* ATCC 55730 em um comprimido e em água por 3 semanas. Os resultados obtidos mostraram que independente do meio de ingestão a população salivar de *S. mutans* foi reduzida significativamente ao final do período de intervenção.

Quando os probióticos *L. reuteri* ATCC 55730 e *L. reuteri* ATCC PTA 5289 na concentração de 10^8 UFC/g foram veiculados por uma goma de mascar por 3 semanas, a redução salivar de *S. mutans* foi significativa quando comparada à redução do mesmo depois do uso de goma de mascar contendo xilitol no mesmo período experimental (ÇAGLAR et al., 2007). Nenhum efeito associado foi observado quando as gomas de mascar contendo xilitol e probióticos foram associadas.

Em outro estudo do mesmo grupo uma pastilha com *L. reuteri* ATCC 55730 e *L. reuteri* ATCC PTA 5289 foi administrada para indivíduos saudáveis com altas populações de *S. mutans* e os resultados apontaram níveis significativamente menores dessa bactéria na saliva com 10 dias de consumo (ÇAGLAR et al., 2006).

A correlação positiva entre a ingestão de probióticos e redução do patógeno da cárie pode ser uma estratégia útil na profilaxia dessa doença em alguns grupos de risco. Pacientes que usam aparelhos ortodônticos fixos podem apresentar alto risco de cárie durante o tratamento e nesse caso a ingestão do probiótico *B. animalis* subsp. *lactis* DN-173 010 mostrou redução nos níveis de estreptococos do grupo mutans (CILDIR et al., 2009).

As mudanças observadas na microbiota salivar fornecem evidências aos profissionais da área para recomendar aos seus pacientes o consumo de probióticos, associado às práticas de higiene oral e ao aconselhamento dietético (STAMATOVA; MEURMAN, 2009).

Em nenhum dos estudos citados, independentemente do probiótico utilizado, os níveis de lactobacilos foram reduzidos quando comparados com os valores basais. Um estudo realizado por Montalto et al. (2004) avaliou a administração de uma preparação contendo 7

espécies de lactobacilos em cápsulas e também na forma líquida e encontraram aumento significativo da população salivar de lactobacilos, enquanto que a população de *S. mutans* permaneceu inalterada. Esses pesquisadores concluíram que o aumento das populações salivares de lactobacilos pode indicar a necessidade de acompanhar de perto a saúde bucal de pacientes submetidos ao tratamento com probióticos a longo prazo, mesmo que quando tratamento é administrado de uma forma que evite o contato direto com a cavidade oral.

Explicações plausíveis para os resultados clínicos da ingestão de probióticos podem ser obtidas a partir dos estudos *in vitro*. A redução observada de *S. mutans* pode ser devido à competição por sítios de ligação nos biofilmes orais. *L. casei* ATCC 11578 mostrou afetar a aderência dos estreptococos sobre a hidroxiapatita pela inibição da adesão ou até mesmo pela liberação dos estreptococos já ligados a ela (HAUKIOJA; LOIMARANTA; TENOVUO, HAUKIOJA; SÖDERLING, TENOVUO, 2008). Vários probióticos têm demonstrado habilidade para modificar a composição da película salivar pela ligação e degradação de proteínas importantes para a adesão bacteriana (STAMATOVA; MEURMAN, 2009).

Embora os probióticos possam afetar os principais patógenos da cárie, os lactobacilos podem também estar associados à progressão da cárie. Algumas cepas de *Lactobacillus* spp., juntamente com o *S. mutans*, são conhecidos por desempenhar um papel chave nos mecanismos etiopatogênicos que conduzem ao desenvolvimento da cárie dentária (MONTALTO et al., 2004). A produção de ácidos orgânicos pelos lactobacilos através dos açúcares da dieta é o fator que leva também à progressão da cárie (MATSUMOTO et al., 2005; SIMARK-MATTSSON et al., 2007; STAMATOVA; MEURMAN, 2009).

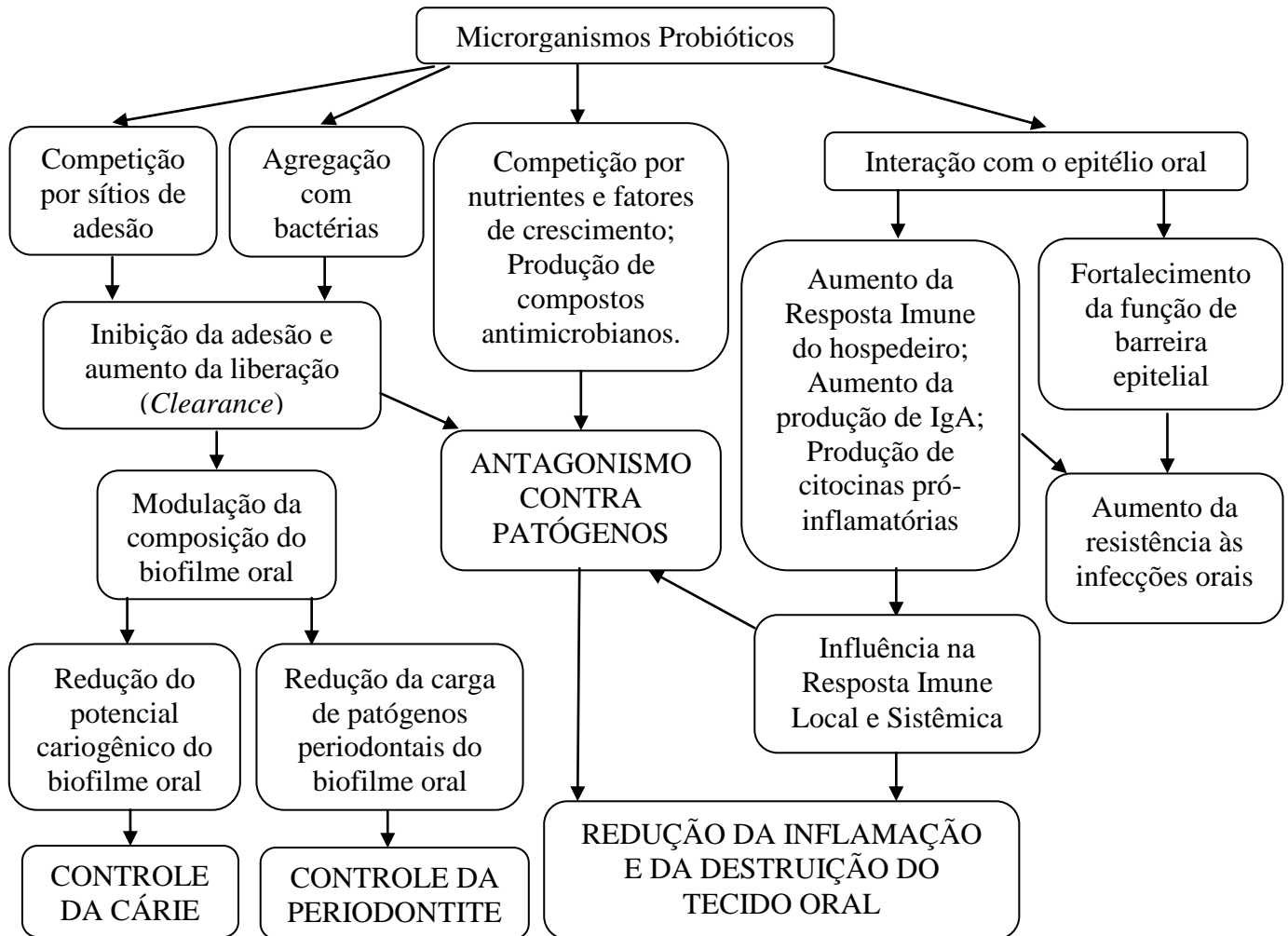
Seis lactobacilos comerciais, *L. plantarum* 299v, *L. plantarum* 931, *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LB12, *L. paracasei* F19 e *L. reuteri* foram avaliados por sua produção de ácido através de vários açúcares e álcoois de açúcares (HEDBERG et al., 2008). Dentre eles, as cepas de *L. plantarum* tiveram a maior atividade fermentativa de glicose, frutose, lactose, sacarose, maltose, trealose e arabinose. A fermentação de glicose, frutose, manitol e trealose pelo *L. rhamnosus* GG resultou em valores de pH entre 5.2 e 6.8, depois de 24 horas de incubação. *L. paracasei* e *L. plantarum* exibiram fermentação muito lenta e os valores de pH alcançaram entre 5,2 e 6,8 após 72 horas de incubação. A incapacidade das cepas de *L. rhamnosus*, *L. paracasei* F19 e *L. reuteri* de fermentar a sacarose fornece importantes

informações sobre a relativa segurança desses microrganismos probióticos na profilaxia da cárie.

A diversidade de testes *in vitro* não permite conclusões claras e recomendações diretas a serem feitas sobre quais probióticos podem fornecer benefícios à saúde oral. Investigações clínicas são necessárias para apoiar a verdadeira eficácia de probióticos na prevenção de doenças orais. Além disso, diferenças interindividuais na composição da microbiota oral pode ser o fator chave para o estabelecimento de bactérias benéficas que mantenham o equilíbrio da saúde oral. Verificou-se que a cavidade oral de indivíduos sem experiência de cárie é colonizada por lactobacilos que possuem uma capacidade significativamente aumentada de suprimir a multiplicação de *S. mutans* comparado aos indivíduos com cárie ativa ou inativa (SIMARK-MATTSSON et al., 2007). Pode-se concluir que os efeitos dos lactobacilos na prevenção da cárie parecem favoráveis desde que a seleção dos probióticos seja cuidadosa (STAMATOVA; MEURMAN, 2009).

A Figura 1 ilustra uma representação esquemática resumida dos possíveis mecanismos de ação dos microrganismos probióticos sobre a cavidade oral.

Figura 1. Representação esquemática de possíveis mecanismos de ação dos microrganismos probióticos sobre a cavidade oral.



FONTE: Modificado de HAUKIOJA, 2010; STAMATOVA; MEURMAN, 2009.

1.6 Microencapsulação de microrganismos probióticos

A microencapsulação é um processo de empacotamento com finas coberturas poliméricas, podendo ser aplicada em sólidos, líquidos ou material gasoso, originando as micropartículas que podem liberar seu conteúdo sob condições específicas (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007; FÁVARO-TRINDADE, 2011; ISLAM et al., 2010).

Essa tecnologia tem sido empregada com êxito em diversas áreas da indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia. Nesse último setor, a microencapsulação tem sido

utilizada há mais de 60 anos para o controle de sabor, cor e textura, e os materiais encapsulados podem ser ácidos, bases, óleos, vitaminas, sais, gases, aminoácidos, óleos essenciais, aromas, edulcorantes, enzimas e microrganismos probióticos (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007; DESAI; PARK, 2005; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2003).

Em decorrência das propriedades de liberação controlada, a microencapsulação deixa de ser somente um método de agregação de substâncias a uma formulação alimentícia, e se torna uma fonte de ingredientes com propriedades únicas. Para que a liberação do material encapsulado ocorra, vários mecanismos de acionamento podem ser usados, como por exemplo, mudança de pH, estresse mecânico, temperatura, atividade enzimática, tempo, força osmótica, entre outros (DESAI; PARK, 2005; GOUIN, 2004).

A microencapsulação na indústria de alimentos apresenta várias aplicações, sendo que as principais são: a proteção do material a ser encapsulado do ambiente externo, de forma a evitar sua degradação; a redução da evaporação do material encapsulado; a modificação das características físicas do material encapsulado, tornando mais fácil sua manipulação; o isolamento de componentes que reajam com outros dentro da matriz do alimento e; para mascarar odor e/ou sabor desagradáveis. Vale ressaltar que no desenvolvimento de produtos alimentícios, as qualidades sensoriais não devem ser comprometidas pela adição de ingredientes encapsulados (DESAI; PARK, 2005).

Outra aplicação muito visada atualmente é a microencapsulação de microrganismos probióticos, que vem sendo utilizada para manter a estabilidade dos mesmos durante o processamento e estocagem dos alimentos. A matriz do alimento e as condições de processo são fatores que determinam a necessidade de encapsulação dos microrganismos. Fatores como pH, atividade de água, teor de gordura e oxigênio são muito importantes, pois influenciam a sobrevivência dos microrganismos probióticos (ROKKA; RANTAMÄKI, 2010). A utilização da microencapsulação também pode aumentar a resistência dessas bactérias na passagem pelo trato gastrointestinal, uma vez que esse meio possui elevada acidez, além da presença de enzimas e da bile, possibilitando que os probióticos cheguem ao intestino com condições de sobrevivência e de colonização (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007; DESAI; PARK 2005; FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

Várias técnicas de microencapsulação têm sido empregadas, e a extrusão é a mais utilizada, devido ao baixo custo e simplicidade, além de não envolver altas temperaturas.

Outros métodos são a atomização (*spray drying*), emulsão, coacervação e imobilização em gorduras e grânulos de amido (FÁVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011). A seleção do processo de microencapsulação é realizada com base nas propriedades físicas e químicas do material que será encapsulado e do encapsulante, além disso, a finalidade e aplicação do ingrediente alimentício também devem ser analisadas (DESAI; PARK, 2005).

O tamanho das microcápsulas pode variar de poucos nm até vários μm e a forma também é bastante variável em função do método e do agente encapsulante utilizados para prepará-las (FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008). Existem diversos tipos de material encapsulante, como por exemplo, o alginato de cálcio, proteínas do soro do leite e gomas. A escolha desse agente depende de uma série de fatores como a não reatividade com o material a ser encapsulado durante o processo de estocagem; o processo utilizado para a formação da microcápsula; o mecanismo de liberação do material encapsulado; suas propriedades reológicas; a habilidade de dispersar ou emulsificar; a capacidade de prover máxima proteção para o material a ser encapsulado contra condições desfavoráveis, além de ser economicamente viável (DESAI; PARK, 2005).

O método mais comum usado para a encapsulação de microrganismos com hidrocolóides é o da extrusão, devido a sua facilidade, simplicidade e baixo custo, além disso, garante maior viabilidade celular. Este método envolve o preparo de uma solução de hidrocolóide, como por exemplo, alginato de sódio, na qual é adicionada uma suspensão de microrganismo. Goteja-se essa mistura através de uma agulha em uma solução contendo cátions multivalentes (cálcio, por exemplo), onde as cápsulas são formadas instantaneamente. O tamanho e o formato das cápsulas dependem do diâmetro da agulha e da distância da queda. A concentração de alginato para formar as cápsulas pode variar de 1 a 2% e da solução de cloreto varia de 0,05 a 1,5M (HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2012; ISLAM et al., 2010; KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003; KUANG; OLIVEIRA; CREAN, 2010).

O alginato de cálcio é muito utilizado para a microencapsulação, não é tóxico sendo, portanto, seguro para a aplicação em alimentos. Além disso, as cápsulas formadas podem ser facilmente revertidas e qualquer ingrediente pode ser encapsulado (DESAI; PARK, 2005; GOUIN, 2004). As cápsulas de alginato de cálcio são formadas quando uma solução de alginato de sódio entra em contato com cátions multivalentes como o cálcio. O alginato de sódio é um polissacarídeo linear constituído por moléculas de ácidos D-manurônicos e L-

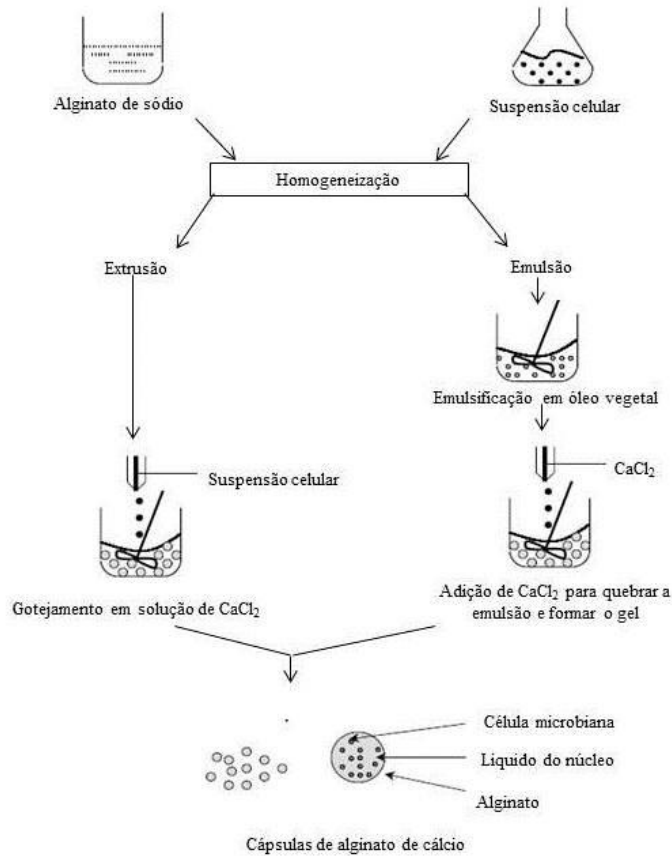
gulurônicos extraídos de algas. As cápsulas de alginato de cálcio são estáveis em pH baixo, mas são frágeis em soluções básicas podendo desintegrar-se (FÁVARO-TRINDADE, 2011; GROSSO; FÁVARO-TRINDADE, 2004).

Na técnica da emulsão, a suspensão de células e polímeros (fase descontínua) é adicionada a um volume grande de óleo vegetal (fase contínua), e a mistura é homogeneizada para formar uma emulsão de água em óleo. Esta emulsão precisa ser quebrada para formar minúsculas gotas de gel dentro da fase oleosa, as quais são separadas por filtração. Existem muitos polímeros usados na técnica de emulsão, como por exemplo, k-carragena, goma locusta, acetato de celulose ftalato, alginato, quitosana, gelatina, polissacarídeos protéicos e proteínas do soro do leite. O tamanho das cápsulas pelo método de emulsão depende da velocidade de agitação na hora da formação da emulsão. Apesar de ser mais simples a produção em maior escala, tem um custo mais elevado ao da extrusão, devido ao uso do óleo vegetal (HEIDEBACK et al., 2012; ISLAM et al., 2010; KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003).

Os microrganismos têm sido microencapsulados ou imobilizados com a finalidade de que os mesmos sejam reutilizados para produção de ácido lático ou de produtos lácteos fermentados e, também, para protegê-los da presença de oxigênio, das baixas temperaturas de congelamento, das condições da boca e do trato gastrointestinal, além de garantir a viabilidade celular durante a vida útil do produto alimentício (FÁVARO-TRINDADE, 2011; GBASSI e VANDAMME, 2012; HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2012; KUANG; OLIVEIRA; CREAN, 2010).

A Figura 2 ilustra, de forma simplificada, os processos de microencapsulação por extrusão e emulsão.

Figura 2. Diagrama de fluxo resumido da microencapsulação de microrganismos pelas técnicas de extrusão e emulsão.



FONTE: KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003.

Diferentes materiais de encapsulação foram testados por Rapacci e Ramos (2008) com a finalidade de verificar a viabilidade do probiótico *Lactobacillus acidophilus* para aplicação em granolas comerciais. Esses pesquisadores avaliaram a microencapsulação do microrganismo em duas gomas acácias simultaneamente (Instantgum BB e Instantgum C TRX) e em uma mistura de concentrado protéico de soro e goma acácia Encapsia (1:1), com subsequente secagem por atomização. Os resultados mostraram que as duas gomas foram mais eficientes na proteção do probiótico, após secagem, em comparação à mistura delas com concentrado protéico de soro. No entanto, a perda de viabilidade do microrganismo microencapsulado com a mistura foi menor ao final do período de armazenamento à temperatura ambiente.

Rapacci, Bevilacqua e Beux (2008) avaliaram a viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* para aplicação em alimentos desidratados e verificaram que a microencapsulação empregando-se concentrado de soro e goma Encapsia mostrou-se eficiente na proteção do microrganismo em estudo após a liofilização, apresentando população elevada (10^9 UFC/g) quando comparado à viabilidade do probiótico na mistura de goma Encapsia, concentrado de soro e fermento líquido (10^8 UFC/g).

Microcápsulas de pectina e caseína secas por *spray drying* foram eficientes para prover proteção aos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* em valores de pH similares ao do estômago humano, sendo que as microcápsulas contendo *L. acidophilus* armazenadas a 7 e 37 °C conservaram a viabilidade desta cultura por 120 dias (OLIVEIRA et al., 2007a).

A utilização de outro material, o ftalato acetato de celulose, por meio da técnica de *spray drying* também já foi avaliada com *Lactobacillus acidophilus* (La-05) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12. Foi verificado que os probióticos microencapsulados sobreviveram à simulação das condições ácidas do estômago, e tanto as formas livres quanto as microencapsuladas resistiram às soluções que simulavam a bile (FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002).

Fávaro-Trindade e Grosso (2000) imobilizaram *Lactobacillus acidophilus* (La-05) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 em alginato de cálcio e observaram que os mesmos sobreviveram às secreções do trato gastrointestinal.

A encapsulação com alginato de cálcio também já foi testada com a finalidade de se aumentar a viabilidade de *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium infantis* em maionese, onde as células livres não foram detectadas depois de 2 semanas, enquanto que as encapsuladas sobreviveram por 8 (*Bifidobacterium infantis*) e 12 (*Bifidobacterium bifidum*) semanas, respectivamente. A maionese contendo bifidobactérias encapsuladas teve baixa população total de microrganismos contaminantes, sendo que bolores e leveduras apareceram somente depois de 12 semanas, contra 6 semanas para as maioneses controle e com probióticos livres (KHALIL; MANSOUR, 1998). É importante ressaltar que a maionese utilizada nesse estudo apresentava pH ácido (4,42) devido a adição de ácido acético, confirmando, assim, a capacidade de proteção da microencapsulação a condições ácidas severas. Assim, a sobrevivência de probióticos encapsulados não é afetada em baixos valores

de pH dos iogurtes ou do suco gástrico humano, o que permite afirmar que a microencapsulação se apresenta como um procedimento útil para assegurar a sobrevivência de células, em alto número, ao transitarem pelo trato gastrointestinal, chegando ao intestino em estado viável para colonizar e conferir os efeitos probióticos desejados (HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2012; KAILASAPATHY, 2002).

Sheu e Marshall (1993) relataram 40% a mais de sobrevivência de lactobacilos durante congelamento de leite quando esses microrganismos foram encapsulados em alginato de cálcio, comparados às células livres. Esses resultados estimularam estudos de incorporação de probióticos encapsulados em sobremesas congeladas e sorvetes (HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2012; HOMAYOUNI et al., 2008; SHEU; MARSHALL; HEYMANN, 1993).

Um estudo realizado por Kim et al. (2008) verificou que a microencapsulação de *L. acidophilus* ATCC 43121 em alginato foi capaz de aumentar a sobrevivência aos sucos gastrointestinais simulados e ao tratamento térmico. Além disso, a capacidade de redução do nível de colesterol pelo probiótico, bem como a adesão às células intestinais não diminuiu com o processo de encapsulação.

Uma coencapsulação de *L. acidophilus* em uma matrix de alginato e goma xantana contendo o prebiótico inulina mostrou ser uma boa forma de proteção ao probiótico para aplicações com liberação controlada. Os resultados de Nazarro et al. (2009) indicaram que o probiótico permaneceu completamente funcional depois da ingestão de suco de cenoura contendo essas cápsulas, o que indica que a sobrevivência desses microrganismos pode depender da matriz ou da concentração de alginato. Esses pesquisadores ainda concluem que a coencapsulação pode aumentar a eficácia dos alimentos funcionais, explorando sinergias entre ingredientes prebióticos e probióticos.

Lee, Cha e Park (2004) avaliaram a sobrevivência de *L. bulgaricus* KFRI 673 em microcápsulas de alginato de cálcio revestidas por uma solução de quitosana e seus resultados indicaram que tanto as células livres quanto as microencapsuladas mostraram estabilidade similar durante 4 semanas de estocagem a 4 °C. No entanto, a viabilidade do microrganismo em microcápsulas de alginato com revestimento de quitosana foi aumentada a 22 °C. Isso pode ter ocorrido provavelmente devido à proteção exercida pela camada de quitosana.

Sabikhi et al. (2008) verificaram a resistência de *L. acidophilus* LA1 microencapsulados em alginato e amido pelo método de emulsão quanto às condições

simuladas do trato gastrointestinal. Os resultados encontrados apontaram uma melhor sobrevivência das microcápsulas quando submetidas a tratamento térmico, a altas concentrações de NaCl e de sais biliares e a baixos valores de pH, quando comparadas às células livres.

Gbassi et al. (2009) avaliaram microcápsulas de *L. plantarum* spp. em matriz de alginato revestido com proteína do soro do leite e concluíram que o probiótico encapsulado e revestido apresentou sua sobrevivência aumentada quando comparado às cápsulas contendo apenas alginato de cálcio como matriz encapsulante.

Um estudo realizado por Hansen et al. (2002) avaliou a sobrevivência de 9 espécies de bifidobactérias frente às condições simuladas do trato gastrointestinal. Eles verificaram que as espécies apresentaram maior resistência quando imobilizadas em alginato de cálcio. Eles também detectaram que duas espécies encapsuladas e adicionadas em leite apresentaram detecção sensorial de *off-flavors*, o que não havia acontecido com as células livres, o que os levou a concluir que provavelmente o metabolismo dos microrganismos foi alterado em função do processo de microencapsulação.

1.7 Goma de mascar

A goma de mascar é comumente relacionada com sendo parte da cultura americana e foi popularizada na Europa durante a Segunda Guerra Mundial. A primeira patente americana para a goma de mascar foi emitida pelo dentista Dr. W.F. Semple em 1869. Mas a mastigação de produtos não alimentares e gomas pode ser rastreada desde as culturas grega e egípcia antigas, entre os Índios Maias e mais tarde pelos Índios Americanos e em todo o Oriente Médio. Hoje, a indústria de goma de mascar movimentada bilhões de dólares em todo o mundo, com uma produção de mais de meio milhão de toneladas anualmente. Os EUA são líderes no consumo de gomas de mascar, com 2,5 kg por habitante, com gastos anuais de mais meio bilhão de dólares (LY; MILGROM; ROTHEN, 2008).

A goma de mascar consiste tipicamente de edulcorantes, goma base e agentes aromatizantes. Historicamente a goma base foi adoçada com sacarose e com isso contribuiu

para a cárie dentária. Hoje, mais de 50% das gomas de mascar são adoçadas com substitutos de açúcar como os polióis (edulcorantes de baixa intensidade) e outros edulcorantes, ou a associação desses. Diversos estudos têm mostrado que as bactérias orais não utilizam esses substitutos de açúcares para produzir ácidos que desmineralizam o esmalte e a dentina. Dessa forma, eles são aceitos como não cariogênicos pelo FDA (U.S. Food and Drug Administration) (LY; MILGROM; ROTHEN, 2008). Além disso, o ato de mascar tem sido recomendado como um meio de aumentar o fluxo sanguíneo dentro e em volta da membrana periodontal, restaurando a circulação linfática e prevenindo e aliviando inflamações e edemas. Isso também estimula o fluxo salivar, aumentando a concentração de bicarbonato e conseqüentemente elevando o pH da placa e a capacidade tampão da saliva, bem como aumentando a taxa de depuração do açúcar oral, dos microrganismos da cavidade oral e de restos alimentares, reduzindo assim a incidência de cárie e a desmineralização (BURT, 2006; HANHAM e ADDY, 2001; IMFELD, 1999; LY; MILGROM; ROTHEN, 2008). Soma-se a isso uma supersaturação mineral que promove uma remineralização do esmalte. No entanto, esse efeito é perdido quando se consome uma goma contendo sacarose (BURT, 2006; IMFELD, 1999).

As gomas de mascar podem ser utilizadas como veículos para agentes preventivos e/ou terapêuticos, com base nisso elas têm sido estudadas e utilizadas como veículos de uma gama de substâncias como cálcio, bicarbonato, clorexidina, flúor e polióis, como o xilitol, além de carrear substâncias medicinais como a nicotina, aspirina, anti-histamínicos, agentes antifúngicos, cafeína e vitaminas (LY; MILGROM; ROTHEN, 2008).

Os edulcorantes polióis, comumente conhecidos como álcoois de açúcar, têm sido utilizados como substitutos de sacarose e frutose em alimentos isentos de carboidratos e em produtos de confeitarias, bem como em produtos farmacêuticos e nutracêuticos. Eles são absorvidos, mas não são metabolizados completamente pelo organismo humano, e por isso contribuem com menos calorias que a sacarose e a frutose. Embora a maioria dos polióis apresente menor poder adoçante do que a sacarose, o maltitol e o xilitol conferem sabor doce semelhante. Os polióis são regulamentados pela FDA e são classificados como sendo GRAS (Generally Recognized As Safe) e aprovados como aditivos alimentares. Além do mais, o FDA autorizou o uso de alegação de saúde nos rótulos dos alimentos, dizendo que os polióis não promovem cárie dentária. Esses edulcorantes não cariogênicos são utilizados em

alimentos, doces e outros produtos comercializados para promoverem uma melhor saúde oral e controle da dieta (LY; MILGROM; ROTHEN, 2006, 2008).

Dentro da classe dos polióis, o xilitol e o sorbitol são os mais estudados. O sorbitol é aceito como não cariogênico, o xilitol, por outro lado, parece conferir uma proteção ativa contra a cárie dentária, através de reduções nos níveis de *S. mutans* e do ácido láctico produzido por essa bactéria (HOLGERSON et al., 2007; LY; MILGROM; ROTHEN, 2006).

Deshpande e Jadad (2008) concluíram em sua revisão sistemática, que há evidências consistentes para apoiar o uso de xilitol e sorbitol em goma de mascar como parte da higiene oral normal para prevenir cárie dentária, no entanto, não são todos os estudos que confirmam o efeito na redução do *S. mutans*.

Em outro estudo, Van Loveren (2004) concluiu que os efeitos de prevenção da cárie atribuídos às gomas contendo polióis parecem estar baseados na estimulação do fluxo salivar, embora o efeito antimicrobiano não possa ser excluído. Além disso, não há nenhuma evidência de uma dose mínima terapêutica ou de um efeito terapêutico do xilitol sobre a cárie.

Recentemente a goma de mascar tem sido utilizada como veículo para os microrganismos probióticos, para que sejam liberados na cavidade oral, onde possam exercer seus efeitos benéficos. Um estudo *in vivo* realizado por Twetman et al. (2009) apontou que o uso de uma goma de mascar contendo o probiótico *L. reuteri* ATCC 55730 reduziu os níveis de citocinas pro-inflamatórias em pacientes com gengivite.

Em outro estudo Keller et al. (2012) demonstraram que o uso diário de uma goma de mascar contendo probiótico pode exercer um efeito benéfico no tratamento da halitose. Os resultados indicaram que esse consumo pode afetar as bactérias que produzem os compostos que causam o mau cheiro, os compostos sulfurados voláteis. Dessa forma, os probióticos podem apresentar uma aplicação potencial como adjuvante para melhorar a higiene oral.

Çaglar et al. (2007) verificaram a administração dos probióticos *L. reuteri* ATCC 55730 e *L. reuteri* ATCC PTA 5289 na concentração de 10^8 UFC/g em uma goma de mascar, consumida por 3 semanas, e os resultados indicaram uma redução salivar de *S. mutans* significativa quando comparada à redução do mesmo depois do consumo de goma de mascar contendo xilitol.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecnologia/alega.htm>. Acesso em: 8 dez. 2010.

AHOLA, A. J.; YLI-KNUUTTILA, H.; SUOMALAINEN, T.; POUSSA, T.; AHLSTRÖM, A.; MEURMAN, J. H.; KORPELA, R. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. **Archives of Oral Biology**, v. 47, p. 799-804, 2002.

AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 999-1008, 2006.

AN, Y. H.; MCGLOHORN, J. B.; BEDNARSKI, B. K.; MARTIN, K. L.; FRIEDMAN, R. J. An open channel flow chamber for characterizing biofilm formation on biomaterial surfaces. **Methods Enzymol.**, v. 337, p. 79-88, 2001.

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

BEIGHTON, D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in caries process. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 33, p. 248-255, 2005.

BONIFAIT, L.; CHANDAD, F.; GRENIER, D. Probiotics for oral health: myth or reality? **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 75, p. 585-590, 2009.

BOSCH, J. A.; TURKENBURG, M.; NAZMI, K.; VEERMAN, C. I.; de GEUS, J. C.; NIEUW AMERONGEN, A. V. Stress as a determinant of saliva-mediated adherence and coadherence of oral and nonoral microorganisms. **Psychosomatic Medicine**, v. 65, p. 604-612, 2003.

BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Research**, v. 45, p. 69-86, 2011.

BRUNSER, O.; GOTTELAND, M. (2010) "Probiotics and Prebiotics in Human Health: An Overview." In: WATSON, R. R.; PREEDY, V. R. **Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics**, 2010. Elsevier Inc. Academic Press, pp. 73-93, 640 p. 1ª edição.

BURT, B. A. The use of sorbitol- and xylitol-sweetened chewing gum in caries control. **The Journal of the American Dental Association**, v. 137, n. 2, p. 190-196, 2006.

ÇAGLAR, E.; CILDIR, S. K.; ERGENELI, S.; SANDALLI, N.; TWETMAN, S. Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 64, n. 5, p. 314-318, 2006.

ÇAGLAR, E.; KARGUL, B.; TANBOGA, I. Bacteriotherapy and probiotics' role oral health. **Oral Diseases**, v. 11, p. 131-137, 2005.

ÇAGLAR, E.; KAVALOGLU, S. C.; KUSCU, O. O.; SANDALLI, N.; HOLGERSON, P. L.; TWETMAN, S. Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli. **Clinical Oral Investigations**, v. 11, p. 425-429, 2007.

ÇAGLAR, E.; KUSCU, O. O.; CILDIR, S. K.; KUVVETLI, S. S.; SANDALLI, N. A probiotic lozenge administered medical device and its effect on salivary mutans streptococci and lactobacilli. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 18, p. 35-39, 2008.

ÇAGLAR, E.; KUSCU, O. O.; KUVVETLI, S. S.; CILDIR, S. K.; SANDALLI, N.; TWETMAN, S. Short-term effect of ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on the number of salivary mutans streptococci and lactobacilli. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 66, p. 154-158, 2008.

ÇAGLAR, E.; SANDALLI, N.; TWETMAN, S.; KAVALOGLU, S.; ERGENELI, S.; SELVI, S. Effect of yogurt with *Bifidobacterium* DN-173 010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in Young adults. **Acta Odontologica Scandinavica**, n. 63, p. 317-320, 2005.

CHALMERS, N. I.; CHEN, T.; HUGHES, C. V. Insights into genus *Veillonella* in the genomics era. In: KOLENBRANDER, P. E. **Oral microbial communities: genomic inquiry and inter- species communication**. Washington DC: ASM Press, 2011.

CHAMPAGNE, C. P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 184-190, 2007.

CILDIR, S. K.; GERMEC, D.; SANDALLI, N.; OZDEMIR, F. I.; ARUN, T.; TWETMAN, S.; ÇAGLAR, E. Reduction of salivary mutans streptococci in orthodontic patients during

daily consumption of yoghurt containing probiotic bacteria. **The European Journal of Orthodontics**, v. 31, p. 407-411, 2009.

COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: *In vitro* evaluation of different methods. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, p. 71-74, 2007.

CUMMINGS, J. H. Probiotics: better health from 'good' bacteria? **British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin**, v. 34, p. 198-202, 2009.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, p. 1361-1394, 2005.

DESHPANDE A.; JADAD, A. R. The impact of polyol-containing chewing gums on dental caries: a systematic review of original randomized controlled trials and observational studies. **The Journal of the American Dental Association**, v. 139, n. 12, p. 1602-1614, 2008.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 15, p. 167-193, 2002.

ELLIS, J. S.; AVERLEY, P. A.; PRESHAW, P. M.; STEELE, J. G.; SEYMOUR, R. A.; THOMASON, J. M. Change in cardiovascular risk status after dental clearance. **British Dental Journal**, v. 202, n. 9, p. 543-544, 2007.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, Argentina 2001. 34 p. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf.

Acesso em outubro de 2012.

FÁVARO-TRINDADE, C. S. (2011) "Microencapsulação de Probióticos". In: SAAD, S. M. I.; da CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. 2011. São Paulo, SP: Livraria Varela, pp. 239-254, 669 p. 1ª edição.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Encapsulação de culturas probióticas. **Boletim SBCTA**, v. 37(supl.), p. 88-93, 2003.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation *L. acidophilus* & *B. lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. **Milchwissenschaft**, v. 55, n. 9, p. 496-499, 2000.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. The effect of the immobilization 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. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n. 4, p. 485-494, 2002.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; HEINEMANN, R. J. B.; PEDROSO, D. L. Developments in probiotic encapsulation. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 6, n. 4, p. 1-8, 2011.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

FAVERI, M.; FERES, M.; SHIBLI, J. A.; HAYACIBARA, R. F.; HAYACIBARA, M. M.; de FIGUEIREDO, L. C. Microbiota of the dorsum of the tongue after plaque accumulation: An experimental study in humans. **Journal of Periodontology**, v. 77, p. 1539-1546, 2006.

GALDEANO, C. M.; PERDIGÓN, G. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. **Clinical and Vaccine Immunological**, v. 13, n. 2, p. 219-226, 2006.

GBASSI, K. G.; VANDAMME, T.; ENNAHAR, S.; MARCHIONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 103-105, 2009.

GBASSI, G. K.; VANDAMME, T. Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. **Pharmaceutics**, v. 4, p. 149-163, 2012.

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

GRÖSCHL, M.; WENDLER, O.; TOPF, H. G.; BOHLENDER, J.; KÖHLER, H. Significance of salivary adrenomedullin in the maintenance of oral health: Stimulation of oral cell proliferation and antibacterial properties. **Regulatory Peptides**, v. 154, p. 16-22, 2009.

GROSSO, C. R. F.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yoghurt. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 151, 156, 2004.

GUPTA, G. Probiotics and periodontal health. **Journal of Medicine and Life**, v. 4, n. 4, p. 387-394, 2011.

HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. Microbiology of periodontal diseases: introduction. **Periodontology 2000**, n. 38, p. 9-12, 2005.

HANHAM, A.; ADDY, M. The effect of chewing sugar-free gum on plaque regrowth at smooth and occlusal surfaces. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 28, p. 255-257, 2001.

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 Microbiology**, v. 19, p. 35-45, 2002.

HATAKKA, K.; AHOLA, A. J.; KNUUTTILA, H.; RICHARDSON, M.; POUSA, T.; MEURMAN, J. H.; KORPELA, R. Probiotics reduce the prevalence of oral candida in the elderly-a randomized control trial. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 2, p. 125-130, 2007.

HAUKIOJA, A. Probiotics and oral health. **European Journal of Dentistry**, v. 4, p. 348-355, 2010.

HAUKIOJA, A.; LOIMARANTA, V.; TENOVUO, J. Probiotic bacteria affect the composition of salivary pellicle and streptococcal adhesion *in vitro*. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 23, p. 336-343, 2008.

HAUKIOJA, A.; SÖDERLING, E.; TENOVUO, J. Acid production from sugars and sugar alcohols by probiotic lactobacilli and bifidobacteria *in vitro*. **Caries Research**, v. 42, p. 449-453, 2008.

HEDBERG, M.; HASSLOF, P.; SJÖSTRÖM, I.; TWETMAN, S.; STECKSEN-BLICKS, C. Sugar fermentation in probiotic bacteria. An *in vitro* study. **Oral Microbiol Immunol**, v. 23, p. 482-485, 2008.

HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, p. 291-311, 2012.

HOLGERSON, P. L.; SJOSTROM, I.; STECKSEN-BLICKS, C.; TWETMAN, S. Dental plaque formation and salivary mutans streptococci in schoolchildren after use of xylitol-containing chewing gum. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 17, n. 2, p. 79-85, 2007.

HOMAYOUNI, A.; AZIZI, A.; EHSANI, M. R.; YARMAND, M. S.; RAZAVI, S. H. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of symbiotic ice cream. **Food Chemistry**, v. 111, p. 50-55, 2008.

IMFELD, T. Chewing gum – facts and fiction: a review of gum-chewing and oral health. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 10, p. 405-419, 1999.

ISLAM, M. A.; YUN, C. H.; CHOI, Y. J.; CHO, C. S. Microencapsulation of live probiotic bacteria. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 1367-1377, 2010.

KAILASAPATHY, K. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potencial applications. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 3 (2), p. 39-48, 2002.

KANG, M. S.; NA, H. S.; OH, J. S. Coaggregation ability of *Weissella cibaria* isolates with *Fusobacterium nucleatum* and their adhesiveness to epithelial cells. **FEMS Microbiology Letters**, v. 253, p. 323-329, 2005.

KEIJSER, B. J.; ZAURA, E.; HUSE, S. M.; van der VOSSSEN, J. M.; SCHUREN, F. H.; MONTIJN, R. C.; ten CATE, J. M.; CRIELAAD, V. V. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. **Journal of Dental Research**, v. 87, p. 1016-1020, 2008.

KELLER, M. K.; HASSLÖF, P.; STECKSÉN-BLICKS, C.; TWETMAN, S. Co-aggregation and growth inhibition of probiotic lactobacilli and clinical isolates of mutans streptococci: An *in vitro* study. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 69, p. 263-268, 2011.

KELLER, M. K.; BARDOW, A.; JENSDOTTIR, T.; LYKKEAA, J.; TWETMAN, S. Effect of chewing gums containing the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* on oral malodour. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 70, p. 246-250, 2012.

KHALIL, A. H.; MANSOUR, E. H. Alginate encapsulation bifidobacterias survival in mayonnaise. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 4, p. 702-705, 1998.

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

KOLENBRANDER, P. E. Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source. **International Journal of Oral Science**, v. 3; p. 49-54, 2011.

KOLENBRANDER, P. E.; PALMER, R. J. Jr.; RICKARD, A. H.; JAKUBOVICS, N. S.; CHALMERS, N. I. DIAZ, P. I. Bacterial interactions and successions during plaque development. **Periodontol 2000**, v. 42, p. 47-79, 2006.

KÖLL-KLAIS, P.; MÄNDAR, R.; LEIBUR, E.; MARCOTTE, H.; HAMMARSTRÖM, L.; MIKELSAAR, M. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: Species composition and antimicrobial activity. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, p. 354-361, 2005.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 329-347, 2008.

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

KRASSE, P. A. C.; CARLSSON, B. A.; DAHL, C. A.; PAULSSON, A. A.; NILSSON, A. A.; SINKIEWICZ, G. B. Decrease gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. **Swedish Dental Journal**, v. 30, n. 2, p. 55-60, 2006.

KUANG, S .S.; OLIVEIRA, J. C.; CREAN, A. M. Microencapsulation as a tool for incorporating bioactive ingredients into food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, p. 951-968, 2010.

LEE, J. S.; CHA, D. S.; PARK, H. J. Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7300-7305, 2004.

LEMOS, J. A.; ABRANCHES, J.; KOO, H.; MARQUIS, R. E.; BURNE, R. A. Protocols to study the physiology of oral biofilms. **Methods in Molecular Biology**, v. 666, p. 87-102, 2010.

LEMOS, J. A.; BURNE, R. A. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. **Microbiology**, v. 154, p. 3247-3255, 2008.

LIMA, L. M.; MOTISUKI, C.; SPOLODORIO, D. M. P.; SANTOS-PINTO, L. *In vitro* evaluation of probiotics microorganisms adhesion to an artificial caries model. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, p. 884-886, 2005.

LY, K. A.; MILGROM, P.; ROTHEN, M. The potential of dental-protective chewing gum in oral health interventions. **The Journal of the American Dental Association**, v. 139, n. 5, p. 553-563, 2008.

LY, K. A.; MILGROM, P.; ROTHEN, M. Xylitol, sweeteners, and dental caries. **Pediatric Dentistry**, v. 28, n. 2, p. 154-163, 2006.

MADHWANI, T.; McBAIN, A. J. Bacteriological effects of a *Lactobacillus reuteri* probiotic on *in vitro* oral biofilms. **Archives of Oral Biology**, v. 56, p. 1264-1273, 2011.

MARSH, P. D. Dental plaque as a biofilm: the significance of pH in health and caries. **Compendium of Continuing Education in Dentistry**, v. 30, n. 2, p. 76-78, 2009.

MARSH, P. D. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. **Dental Clinics of North America**, v. 54, n. 3, p. 441-454, 2010.

MATSUMOTO, M.; TSUJI, M.; SASAKI, H.; FUJITA, K.; NOMURA, R.; NAKANO, K.; SHINTANI, S.; OOSHIMA, T. Cariogenicity of the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* in rats. **Caries Research**, v. 39, p. 479-483, 2005.

MÉDICI, M. MOLINA, V.; FONT DE VALDEZ, G. Estudios in vivo para la selección de bacterias lácticas probióticas: organización de un banco de cepas. In: II INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON LACTIC ACID BACTERIA, 2006, Tucumán, Argentina. **Anais...** Tucumán: First Argentinean LAB Net Meeting International, 2006.

MEURMAN, J. H. Probiotics: Do they have a role in oral medicine and dentistry? **European Journal of Oral Sciences**, v. 133, n. 3, p. 188-196, 2005.

MEURMAN, J. H.; ANTILA, H.; KORHONEN, A.; SALMINEN, S. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103) on the growth of *Streptococcus sobrinus* *in vitro*. **European Journal of Oral Science**, v. 103, p. 253-258, 1995.

MOLINA, V.; MÉDICI, M.; TARANTO, M. P., FONT DE VALDEZ, G. Selección de bacterias lácticas probióticas para derivados de soja. In: II INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON LACTIC ACID BACTERIA, 2006, Tucumán, Argentina. **Anais...** Tucumán: First Argentinean LAB Net Meeting International, 2006.

MONTALTO, M.; VASTOLA, M.; MARIGO, L.; COVINO, M.; GRAZIOSETTO, R.; CURIGLIANO, V.; SANTORO, L.; CUOCO, L.; MANNA, R.; GASBARRINI, G. Probiotic treatment increases salivary counts of lactobacilli: A double-blind, randomized, controlled study. **Digestion**, v. 69, p. 53-56, 2004.

MORALES, D. K.; HOGAN, D. A. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. 1-4, 2010.

NÄSE, L.; HATAKKA, K.; SAVILAHTI, E.; SAXELIN, M.; PÖNKÄ, A.; POUSSA, T.; KORPELA, R.; MEURMAN, J. H. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. **Caries Research**, v. 35, p. 412-420, 2001.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; SADA, A.; ORLANDO, P. Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 3, p. 319-323, 2009.

NIKAWA, H.; MIKIHARA, S.; EGUSA, H.; FUKUSHIMA, H.; KAWABATA, R.; HAMADA, T.; YATANI, H. *Candida* adherence and biofilm formation on oral surfaces. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 46, n. 4, p. 233-242, 2005.

OLIVEIRA, A. C.; MORETTI, T. S.; BOSCHINI, C.; BALIERO, J. C. C.; FREITAS, O.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, v. 24, n. 7, p. 685-693, 2007a.

O'SULLIVAN, D. J. Primary Sources of Probiotic Cultures. In: AHMEDNA, M.; GOKTEPE, I.; JUNEJA, V. K. **Probiotics in food safety and human health**. Boca Raton: Taylor & Francis, pp. 91-108, 512 p., 2006.

PALMER, R. J. Jr.; KAZMERZAK, K.; HANSEN, M. C.; KOLENBRANDER, P. E. Mutualism versus independence: strategies of mixed-species oral biofilms *in vitro* using saliva as the sole nutrient source. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 5794–5804, 2001.

PERCIVAL, S. L. Probiotics and the Ageing Gut. In: PERCIVAL, S. L. **Microbiology and Aging: Clinical Manifestations**. Springer, New York, pp. 275-289, 2008.

PETTI, S.; TARSITANI, A.; D'ARCA, S. Antibacterial activity of yoghurt against viridans streptococci *in vitro*. **Archives of Oral Biology**, v. 53, p. 985-990, 2008.

PHAM, L. C.; VAN SPANNING, R. J. M. V.; RÖLING, W. F. M.; PROSPERI, A. C.; TEREFWORK, Z.; TEN CATE, J. M. T.; CRIELAARD, W.; ZAURA, E. Effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* W24 on the compositional stability of oral microbial communities. **Archives of Oral Biology**, v. 54, p. 132-137, 2009.

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

RAPACCI, M.; BEVILACQUA, C.; BEUX, M. R. Avaliação da viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* para aplicação em alimentos desidratados. In: XVI SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E X MOSTRA DE PESQUISA, PUC-PR, 2008, Curitiba. **Anais...** 2008.

RAPACCI, M.; RAMOS, V. A. Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado com diferentes materiais de encapsulamento para adição em granolas comerciais. In: XVI SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E X MOSTRA DE PESQUISA, PUC-PR, 2008, Curitiba. **Anais...** 2008.

REMIS, J. P.; COSTERTON, J. W.; AUER, M. Biofilms: structures that may facilitate cell-cell interactions. **International Society for Microbial Ecology (The ISME Journal)**, v. 4, p. 1085-1087, 2010.

RICCIA, D. N. D.; BIZZINI, F.; PERILI, M. G.; POLIMENNI, A.; TRINCEIRRI, V. Antiinflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. **Oral Disease**, v. 13, p. 376-385, 2007.

ROKKA, S.; RANTAMÄKI, P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. **European Food Research and Technology**, v. 231, p. 1-12, 2010.

ROSSI, E. A.; CAVALLINI, D. C. U.; MANZONI, M. S. J.; ROSSI, P. R. (2011) “Produtos Probióticos e Prebióticos à Base de Soja.” In: SAAD, S. M. I.; da CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. 2011. São Paulo, SP: Livraria Varela, pp. 541-563, 669 p. 1ª edição.

ROZEN, R.; BACRACH, G.; STEINBERG, D. Effect of carbohydrates on fructosyltransferase expression and distribution in *Streptococcus mutans* GS-5 biofilms. **Carbohydrates Research**, v. 339, n. 18, p. 2883-2888, 2004.

RUDNEY, J. D. Saliva and dental plaque. **Advances in Dental Research**, v. 14, p. 29-39, 2000.

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

SAAD, S. M. I.; BEDANI, R.; MAMIZUKA, E. M. (2011) “Benefícios à Saúde dos Probióticos e Prebióticos.” In: SAAD, S. M. I.; da CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. 2011. São Paulo, SP: Livraria Varela, pp. 51-84, 669 p. 1ª edição.

SABIKHI, L.; BABU, R.; THOMPSON, D. K.; KAPILA, S. Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. **Food Bioprocess Technology**, DOI 10.1007/s11947-008-0135-1, 2008.

SCANNAPIECO, F. A.; DASANAYAKE, A. P.; CHUN, N. “Does periodontal therapy reduce the risk for systemic diseases?” **Dental Clinics of North America**, v. 54, n. 1, p. 163-168, 2010.

SHEU, T. Y.; MARSHALL, R. T. Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 557-561, 1993.

SHEU, T. Y.; MARSHALL, R. T.; HEYMANN, H. Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1902-1907, 1993.

SIMARK-MATTSSON, C.; EMILSON, C. G.; HÄKANSSON, E.; JACOBSON, C.; ROOS, K.; HOLM, S. Lactobacillus-mediated interference of mutans streptococci in caries-free vs. caries-active subjects. **European Journal of Oral Science**, v. 115, p. 308-314, 2007.

SINGH, K.; KALLALI, B.; KUMAR, A.; THAKER, V. Probiotics: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S287-S290, 2011.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - A review. **Appetite**, v. 51, p. 456– 467, 2008.

SIVIERI, K.; SPINARDI-BARBISAN, A. L. T.; BARBISAN, L. F.; BEDANI, R.; PAULY, N. D.; CARLOS, I. Z.; BENZATTI, F.; VENDRAMINI, R. C.; ROSSI, E. A. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male Wistar rats. **European Food Research and Technology**, v. 228, p. 231-237, 2008.

STAMATOVA, I.; KARI, K.; MEURMAN, J. H. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of putative probiotic lactobacilli against oral pathogens. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v. 2, p. 225-232, 2007.

STAMATOVA, I.; KARI, K.; VLADIMIROV, S.; MEURMAN, J. H. *In vitro* evaluation of yoghurt starter lactobacilli and *Lactobacillus rhamnosus* GG adhesion to saliva-coated surfaces. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 24, p. 218–223, 2009.

STAMATOVA, I.; MEURMAN, J. H. Probiotics: Health benefits in the mouth. **American Journal of Dentistry**, v. 22, n. 6, p. 329-338, 2009.

STEINBERG, D.; EYAL, S. Initial biofilm formation of *Streptococcus sobrinus* on various orthodontics appliances. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 31, n. 11, p. 1041-1045, 2004.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. **Caries Research**, v. 42, p. 409-418, 2008.

TAKEDA, S.; TAKESHITA, M.; KIKUCHI, Y.; DASHNYAM, B.; KAWAHARA, S.; YOSHIDA, H.; WATANABE, W.; MUGURUMA, M.; KUROKAWA, M. Efficacy of oral administration of heat-killed probiotics from Mongolian dairy products against influenza infection in mice: Alleviation of influenza infection by its immunomodulatory activity through intestinal immunity. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 1976-1983, 2011.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; **Microbiologia**. 4. ed. 718 p. São Paulo: Atheneu, 2004.

TURK, B. T.; ATES, M.; SEN, B. H. The effect of treatment of radicular dentin on colonization patterns of *C. albicans*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 106, n. 3, p. 456-462, 2008.

TWETMAN, S.; DERAWI, B.; KELLER, M.; EKSTRAND, K.; YUCEL-LINDBERG, T.; STECKSÉN-BLICKS, C. Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 67, p. 19-24, 2009.

TWETMAN, S.; STECKSEN-BLICKS, C. Probiotics and oral health effects in children. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 18, p. 3-10, 2008.

Van LOVEREN, C. Sugar Alcohols: What is the evidence for caries-preventive and caries-therapeutic effects? **Caries Research**, v. 38, p. 286-293, 2004.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 714-728, 2008.

YASUI, H.; KIYOSHIMA, J.; HORI, T. Reduction of influenza virus titer and protection against influenza virus infection in infant mice fed *Lactobacillus casei* Shirota. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 4, p. 675-679, 2004.

Capítulo 2

Efeito da microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 sobre sua viabilidade em diferentes temperaturas e em condições gastrointestinais simuladas.

Nadiége Dourado PAULY-SILVEIRA*; Tathiê Paiva IGNÁCIO; Mariana Nougalli ROSELINO; Livia Cristina OLIVEIRA; Daniela Cardoso Umbelino CAVALLINI; Roseli Aparecida PINTO; Katia SIVIERI; Graciela Fon't de VALDEZ; Elizeu Antonio ROSSI.

Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Rodovia Araraquara-Jaú, Km1, Araraquara, SP, CP 502, CEP: 14.801-902, Brasil. *Autor correspondente: nadifcf@hotmail.com

Abstract

The microencapsulation of probiotic microorganisms has been carried out in order to improve stability and maintain their viabilities during foods processing and storage. The aim of this study was to evaluate the viability, at room ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) and refrigeration ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) temperatures, and under simulated gastrointestinal conditions, of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014, in free and microencapsulated forms, followed or not by freeze-drying, using six encapsulating matrices based on sodium alginate. Six microencapsulation methods have been employed, five extrusion (“A”, “B”, “C”, “D”, and “E”) and one emulsion (“F”). The method “D” had the prebiotic inulin in its composition and the method “E” was subsequently coated by chitosan solution. The microencapsulation methods were performed by adding 20% of cell culture to solutions of sodium alginate. The capsules were placed in sterile vials, stored at room temperature and refrigeration. The freeze-dried capsules were kept at room temperature. The viability of the microorganism *L. acidophilus* was evaluated for a period of 126 days at room temperature and 161 days under refrigeration and for freeze-dried capsules. The microorganisms in free and microencapsulation forms were submitted to survival test of the simulated gastrointestinal conditions: simulated gastric fluid (SGF/120 min) and simulated intestinal fluid (SIF/180 min). The results were statistically evaluated ($p < 0.05$). It was found that the method “E” was effective in protecting *L. acidophilus* at room

temperature for 119 days, whereas under refrigeration, the method “F” was the most effective, maintaining the microorganism viable for 154 days. The “B” method followed by freeze-drying was able to keep the viability also for 154 days at room temperature. The counts of the free microorganism submitted to SGF and SIF showed higher viable cell counts than those ones observed from the microencapsulated microorganism by all of the methods, however, the probiotic showed also higher initial count, presenting one log cycle of decline when submitted to SGF. The comparison showed that the “E” method conferred greater resistance to *L. acidophilus* as opposed to the SGF with maintenance of the same logarithmic order of the initial count. When the microorganism was submitted to SIF no reduction of log cycle was detected for any technique and the “F” method provided larger resistance to the probiotic. In general, it can be stated that the process of probiotic microencapsulation is an advantageous regarding protection to this microorganisms, especially when associated to freeze-drying method, keeping them viable at room temperature, thus opening the possibility of incorporating these bacteria in food that must be stored at this temperature.

Keywords: Lactic acid bacteria, Probiotics, Microencapsulation, Freeze-drying.

Resumo

A microencapsulação de microrganismos probióticos tem sido aplicada com o intuito de promover maior estabilidade e manutenção da viabilidade dos mesmos durante o processamento e a estocagem de alimentos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a viabilidade, em temperaturas ambiente ($25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) e de refrigeração ($5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$), e em condições simuladas do trato gastrointestinal, do microrganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014, nas formas livre e microencapsulada, seguidas ou não de liofilização, utilizando-se seis diferentes matrizes encapsulantes à base de alginato de sódio. Seis métodos de microencapsulação foram empregados, sendo cinco por extrusão (“A”, “B”, “C”, “D” e “E”) e um por emulsão (“F”). O método “D” continha o prebiótico inulina em sua composição e o método “E” foi posteriormente revestido por quitosana. As microencapsulações foram realizadas adicionando-se 20% de cultivo celular às soluções de alginato de sódio. As

cápsulas foram acondicionadas em frascos estéreis, armazenadas em temperaturas ambiente e de refrigeração. As cápsulas liofilizadas foram mantidas em temperatura ambiente. A viabilidade do microrganismo *L. acidophilus* foi avaliada por um período de 126 dias em temperatura ambiente e 161 dias sob refrigeração e para as cápsulas liofilizadas. Os microrganismos livres e as cápsulas foram submetidos ao teste de sobrevivência às condições simuladas do trato gastrointestinal: fluido gástrico simulado (FGS/120 min) e fluido intestinal simulado (FIS/180 min). Os resultados foram avaliados estatisticamente ($p < 0,05$). Verificou-se que o método de microencapsulação “E” mostrou-se eficiente na proteção do *L. acidophilus* em temperatura ambiente durante 119 dias, enquanto que sob refrigeração o método “F” foi o mais eficaz, mantendo o microrganismo viável por 154 dias. O método “B” seguido de liofilização foi capaz de manter a viabilidade também por 154 dias, em temperatura ambiente. As populações do microrganismo livre submetido ao FGS e ao FIS apontaram contagens de células viáveis superiores às verificadas para o microrganismo microencapsulado por todos os métodos, no entanto, o probiótico livre apresentou população inicial superior, havendo queda de 1 ciclo log quando submetido ao FGS. A comparação entre métodos evidenciou que a microencapsulação “E” conferiu maior resistência ao *L. acidophilus* frente ao FGS com manutenção da mesma ordem logarítmica da população inicial. Quando o microrganismo foi submetido ao FIS não houve redução da ordem de grandeza para nenhuma técnica e o método “F” demonstrou maior resistência para o probiótico. De maneira geral, pode-se afirmar que o processo de microencapsulação de microrganismos probióticos traz vantagens quanto à proteção dos mesmos, principalmente quando associado à liofilização, mantendo-os viáveis em temperatura ambiente, abrindo, assim, a possibilidade de incorporação destas bactérias em alimentos que devam ser estocados nessa temperatura.

Palavras-chave: Bactérias lácticas, Probióticos, Microencapsulação, Liofilização.

Introdução

A busca por alimentos funcionais tem aumentado consideravelmente, uma vez que os alimentos passaram a ser vistos não somente como uma fonte de nutrientes, mas também

como promotores de bem estar e saúde, devido à redução do risco de doenças (SIRÓ et al., 2008). Dentro deste contexto, os probióticos têm sido amplamente estudados para sua aplicação em alimentos, sendo descritos como “microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001).

Os benefícios à saúde atribuídos à ingestão dos probióticos têm sido evidenciados em inúmeras pesquisas, como no tratamento e prevenção da diarreia, na redução dos níveis de colesterol sanguíneo, modulação do sistema imune, diminuição dos sintomas da intolerância à lactose, aumento da absorção de minerais, alívio da constipação, efeitos antimutagênicos, anticarcinogênicos e antihipertensivos e produção de vitamina B (CUMMINGS, 2009; PERCIVAL, 2008; VASILJEVIC e SHAH, 2008).

Um microrganismo probiótico deve necessariamente sobreviver às condições ácidas do estômago, resistir à bile e às enzimas pancreáticas, colonizar o intestino, mesmo que temporariamente, por meio da adesão ao epitélio intestinal, produzir substâncias antimicrobianas impedindo, dessa forma, o desenvolvimento de patógenos e modulando a imunidade inata, além de não apresentar capacidade de translocação (BRUNSER e GOTTELAND, 2010).

A manutenção da viabilidade das culturas probióticas nos alimentos funcionais constituem grandes desafios tecnológicos para as indústrias que buscam sistemas que sejam capazes de proteger esses microrganismos das condições desfavoráveis do meio, durante o processamento, o armazenamento e a passagem pelo trato gastrointestinal após terem sido ingeridos (HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2012; KUANG; OLIVEIRA; CREAN, 2010). Nesse sentido, propostas de microencapsulação têm sido apresentadas por alguns pesquisadores e junto com elas vários métodos já foram avaliados com a finalidade de incorporar microrganismos probióticos em alimentos funcionais, fermentados ou não, como forma de proporcionar a eles uma maior estabilidade (FÁVARO-TRINDADE, 2011; HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2012; ISLAM et al., 2010).

Diante dos potenciais efeitos benéficos dos microrganismos probióticos na prevenção de diversas doenças, da escassez de alimentos mantidos em temperatura ambiente contendo probióticos e da eficácia dos diferentes métodos de microencapsulação desses microrganismos citados na literatura, pareceu-nos oportuno verificar, dentre seis métodos de

microencapsulação, seguidos ou não de liofilização, o mais adequado na manutenção da viabilidade do microrganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 quando mantido em temperatura ambiente e refrigerado.

Material e Métodos

Microrganismo probiótico

Foi utilizada uma cepa de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014, procedente da coleção de cultivo do Centro de Referência para Lactobacilos - CERELA (S.M. Tucuman, Argentina).

Preparo e manutenção da suspensão probiótica

A cultura láctica foi mantida congelada (-80 °C) em um meio composto de leite em pó desnatado Molico (Nestlé, São Paulo, Brasil), reconstituído a 10%, suplementado com 1% de glicose (D Anidra P.A. – A.C.S., Synth, Diadema, Brasil), 0,5% de extrato de levedura (Yeast Extract - Acumedia – Manufacturing, Inc., Baltimore, Maryland, EUA) e 5% de glicerina bidestilada USP (Synth).

O inóculo foi preparado pela transferência de 10% da cultura de manutenção, ativadas em dois meios distintos previamente esterilizados: meio de leite reconstituído a 10% (isento de glicerol) e caldo Lactobacilli MRS (de Man, Rogosa and Sharpe - Acumedia – Manufacturing, Inc., Baltimore, Maryland, EUA), usado para o cultivo de lactobacilos. A escolha do meio de cultivo foi feita de acordo com a metodologia de microencapsulação empregada. Os meios inoculados foram incubados em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas para posterior utilização (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Contagem de células viáveis

O microrganismo utilizado como controle, não encapsulado (células livres), cultivado em meio de leite ou em caldo MRS, dependendo do método a ser avaliado, foi submetido a diluições seriadas em água peptonada fosfatada e posteriormente plaqueado em ágar Lactobacilli MRS (de Man, Rogosa and Sharpe - Acumedia – Manufacturing, Inc., Baltimore, Maryland, EUA), indicado para o gênero lactobacilos, incubado a 37 °C por 48 horas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

A população de lactobacilos nas cápsulas foi determinada após homogeneização das mesmas, na quantidade de 1g de cápsulas para 100 mL de em água peptonada estéril, em Homogeneizador de Alimentos (130/1 - Nova Ética, Produtos e Equipamentos Científica LTDA, Vargem Grande Paulista, Brasil), por 30 minutos, seguida de diluição seriada em água peptonada, partindo para a 3ª diluição, com posterior plaqueamento em profundidade (*pour plate*) em ágar MRS e incubação a 37 °C por 48 horas.

Microencapsulação do probiótico

As microencapsulações foram realizadas adicionando-se 20% de cultivo celular às soluções de alginato de sódio. As cápsulas que foram liofilizadas em Liofilizador ModulyoD Freeze Dryer (Thermo Electron Corporation) foram previamente adicionadas de 5% de glicerina bidestilada USP (Synth) na suspensão de alginato de sódio, como crioprotetor.

Microencapsulação “A”

O microrganismo *L. acidophilus* CRL 1014 foi extrusado com alginato de sódio de baixa viscosidade (Vetec, Química Fina LTDA, Duque de Caxias, Brasil) em cloreto de cálcio dihidratado (Synth, Diadema, Brasil), de acordo com a metodologia descrita por Fávares-Trindade e Grosso (2000).

Microencapsulação “B”

O probiótico *L. acidophilus* CRL 1014 foi encapsulado com alginato de sódio de baixa viscosidade (Vetec) em cloreto de cálcio dihidratado (Synth), segundo Fávoro-Trindade e Grosso (2000), com pequena modificação da metodologia, na qual a concentração da solução de alginato de sódio foi aumentada para 2%.

Microencapsulação “C”

A microencapsulação do cultivo celular de *L. acidophilus* CRL 1014 se deu em alginato de sódio de baixa viscosidade (Vetec), caldo MRS (Acumedia), goma xantana (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e Tween 80 (Merck, Darmstadt, Alemanha), seguido de extrusão em cloreto de cálcio dihidratado (Synth), de acordo com metodologia descrita por Kim et al. (2008).

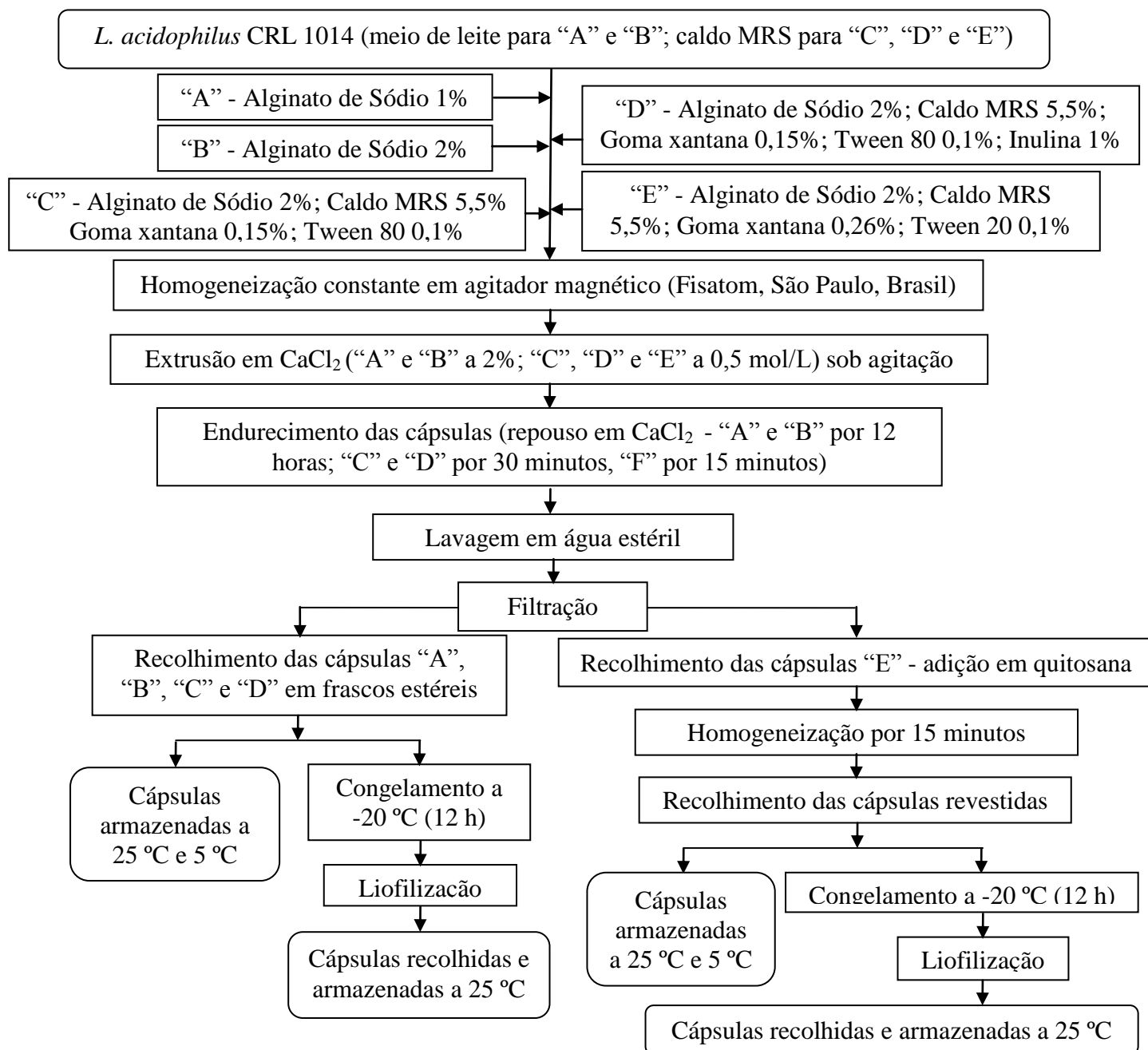
Microencapsulação “D”

O microrganismo *L. acidophilus* CRL 1014 foi microencapsulado em alginato de sódio de baixa viscosidade (Vetec), caldo MRS (Acumedia), goma xantana (Sigma-Aldrich), inulina Beneo Orafiti[®]GR (Orafiti, Oreye, Bélgica) e Tween 80 (Merck), seguido de extrusão em cloreto de cálcio dihidratado (Synth), de acordo com procedimento descrito por Nazzaro et al. (2009).

Microencapsulação “E”

A microencapsulação do microrganismo *L. acidophilus* CRL 1014 foi realizada em alginato de sódio de baixa viscosidade (Vetec), caldo MRS (Acumedia), goma xantana (Sigma-Aldrich) e Tween 20 (Merck, Darmstadt, Alemanha), com extrusão em cloreto de cálcio dihidratado (Synth), sendo que as cápsulas foram posteriormente revestidas com uma solução 0,8% de quitosana (Reativa, Araraquara, Brasil) em 1% de ácido láctico (Merck, Darmstadt, Alemanha) segundo procedimento descrito por Lee, Cha e Park (2004). Um esquema que mostra de maneira resumida e simplificada todos os processos de microencapsulação por extrusão é apresentado na Figura 1.

Figura 1. Representação esquemática dos métodos “A”, “B”, “C”, “D” e “E” de microencapsulação por extrusão.

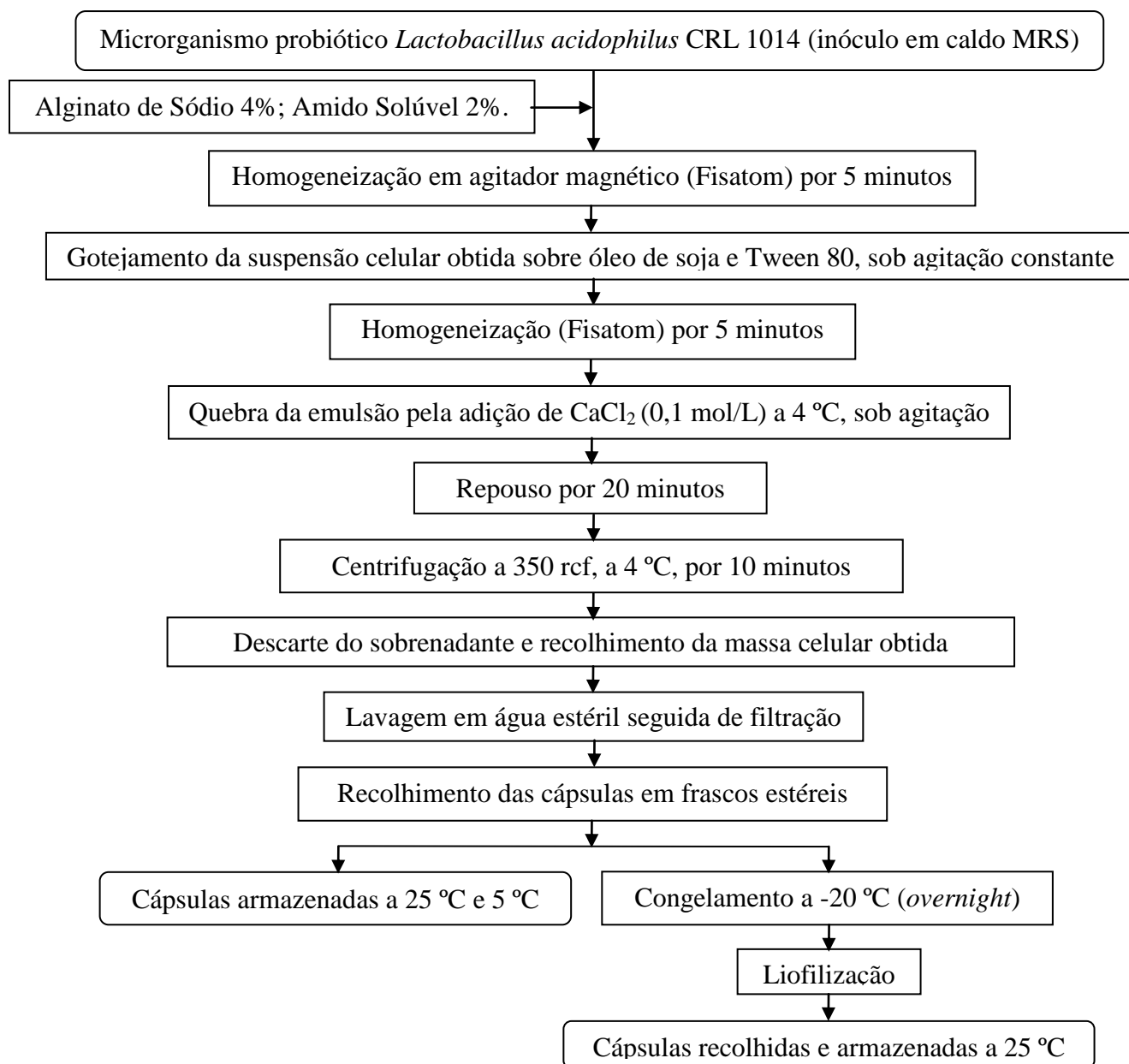


Microencapsulação “F”

A microencapsulação do microrganismo *L. acidophilus* CRL 1014 pelo método de emulsão foi realizada utilizando alginato de sódio de baixa viscosidade (Vetec) e amido solúvel (PA, Merck, Darmstadt, Alemanha) em óleo de soja Soya (Bunge, Jaquaré, Brasil) e

Tween 80 (Merck), adicionada de cloreto de cálcio dihidratado (Synth) e posteriormente centrifugada em Centrífuga Refrigerada Hitachi (modelo CR22GII) e filtrada, de acordo com modificação do procedimento descrito por Sabikhi et al. (2008), que posteriormente revestiu as cápsulas com ácido esteárico, etapa que não foi realizada no presente estudo. Um esquema que mostra de maneira simplificada o processo de microencapsulação por emulsão é apresentado na Figura 2.

Figura 2. Representação esquemática do método “F” de microencapsulação por emulsão.



Viabilidade do microrganismo nas microcápsulas

A viabilidade do microrganismo probiótico *L. acidophilus* CRL 1014, tanto na forma livre quanto nas microcápsulas mantidas em temperatura ambiente e sob refrigeração e nas microcápsulas liofilizadas, mantidas em temperatura ambiente, foram avaliadas semanalmente, através do plaqueamento em ágar MRS, por um período variável que foi definido pelo número de células viáveis verificadas, sendo que ao atingir o valor de $5 \log_{10}$ UFC/g os testes foram encerrados.

Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 frente aos fluidos gastrointestinais simulados (FGS e FIS)

O microrganismo *L. acidophilus* CRL 1014 foi submetido, nas formas livre (cultivo em caldo MRS) e microencapsuladas, ao teste de sobrevivência frente às condições simuladas do trato gastrointestinal, segundo metodologia descrita por Gbassi et al., (2009), em que as cápsulas e a suspensão celular (cultivo em caldo MRS) do probiótico foram incubadas separadamente em FGS por 120 minutos e em FIS por 180 minutos a 37 °C, sendo posteriormente plaqueadas em profundidade em ágar MRS. O teste de sobrevivência em questão foi executado logo após os inóculos (cultivos puros) e as cápsulas terem sido preparados.

O fluido gástrico simulado (FGS) consistiu de 9 g/L de cloreto de sódio (PA ACS Merck, Darmstadt, Alemanha) contendo 3 g/L de pepsina de mucosa estomacal suína (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), com ajuste de pH para 1,8. O fluido intestinal simulado (FIS) consistiu de 9 g/L de cloreto de sódio (Merck) contendo pancreatina (Sigma-Aldrich) e tripsina de pâncreas bovino (Sigma-Aldrich) na quantidade de 10 g/L cada e 3 g/L de sais biliares (Oxgall, Difco, Sparks, MD, EUA), com ajuste de pH para 6,5 (GBASSI et al., 2009). Os ajustes de pH foram realizados com soluções diluídas de ácido clorídrico (Merck) e hidróxido de sódio (Merck) preparadas em laboratório.

Análise Estatística dos Resultados

Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa BioEstat 5.0, e teste de médias de Tukey. Também foram utilizados os Testes F e T para as análises estatísticas entre duas médias (para o teste de sobrevivência gastrointestinal). As diferenças foram consideradas significativas ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Microencapsulação do probiótico

O processo de microencapsulação de bactérias lácticas é uma tecnologia que tem sido empregada para auxiliar na manutenção da viabilidade dos microrganismos probióticos em alimentos funcionais, protegendo-os das condições desfavoráveis do meio, do processamento e das condições de armazenamento desses alimentos.

A viabilidade do microrganismo *L. acidophilus* CRL 1014, nas formas livre e microencapsulada, através das metodologias “A”, “B”, “C”, “D”, “E” e “F”, foi testada ao longo de 126 dias em temperatura ambiente ($25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) e 161 dias em temperatura de refrigeração ($5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$). O cultivo celular do microrganismo em questão foi mantido em refrigeração e foi utilizado como controle da viabilidade.

De acordo com a lista de alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde adotada pela ANVISA (2008) “a quantidade mínima de microrganismos viáveis para que o alimento seja considerado probiótico deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia.” Mediante essa condição, no presente estudo, foi admitido $6\text{ log}_{10}\text{UFC/g}$ como a população mínima adequada para os probióticos, e dessa forma, o acompanhamento da viabilidade dos microrganismos em estudo foi realizado até que a população atingisse valores na ordem de 5

\log_{10} UFC/g, sendo esse, portanto, o valor de corte dos testes de viabilidade. Isso explica as diferenças nos tempos de avaliação entre as viabilidades, em temperatura ambiente e sob refrigeração, bem como das cápsulas liofilizadas.

Na Tabela 1 são apresentados os resultados da viabilidade do *L. acidophilus* CRL 1014 microencapsulado pelos métodos anteriormente citados, mantidos em temperatura ambiente.

Tabela 1. Viabilidade (\log_{10} UFC/g) dos cultivos celulares de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 microencapsulados (“A”, “B”, “C”, “D”, “E” e “F”), mantidos em temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Tempo (dias)	Tratamentos						
	¹ Controle	“A”	“B”	“C”	“D”	“E”	“F”
T 0	9,14 ^{Ba}	8,62 ^{Bb}	8,42 ^{Cd}	8,63 ^{Ab}	8,47 ^{Ac}	8,56 ^{Cbc}	8,46 ^{Ccd}
T 7	9,05 ^{BCa}	8,72 ^{Ac}	8,70 ^{Ac}	8,42 ^{Bd}	7,59 ^{Bf}	8,94 ^{Ab}	8,33 ^{De}
T 14	8,99 ^{Ca}	8,24 ^{Cd}	8,59 ^{Bb}	8,33 ^{Cd}	6,83 ^{Ce}	8,62 ^{BCbc}	8,56 ^{Bc}
T 21	8,73 ^{DEa}	7,99 ^{Dd}	8,12 ^{Dbc}	8,19 ^{Db}	6,20 ^{Df}	8,03 ^{Hcd}	7,05 ^{He}
T 28	8,66 ^{EFa}	7,86 ^{Ed}	8,12 ^{Dc}	8,12 ^{Ec}	6,77 ^{Ce}	8,09 ^{GHc}	8,53 ^{BCb}
T 35	8,54 ^{FGa}	7,57 ^{Fd}	7,37 ^{Ee}	8,21 ^{Dc}	6,03 ^{Df}	8,58 ^{Ca}	8,34 ^{Db}
T 42	8,52 ^{Ga}	7,09 ^{Ge}	6,44 ^{Ff}	8,09 ^{Fc}	6,06 ^{Dg}	8,31 ^{DEFb}	8,03 ^{Ed}
T 49	8,42 ^{Gc}	7,05 ^{Ge}	5,58 ^{Gf}	7,33 ^{Gd}	5,63 ^{Ef}	8,74 ^{Bb}	9,53 ^{Aa}
T 56	9,40 ^{Aa}	6,57 ^{Hd}		6,57 ^{Hd}		8,41 ^{Db}	7,98 ^{Ec}
T 63	9,35 ^{Aa}	6,09 ^{Id}		5,81 ^{Ie}		8,33 ^{DEb}	7,95 ^{Fc}
T 70	9,13 ^{Ba}	5,61 ^{Jd}				8,26 ^{EFb}	7,84 ^{Fc}
T 77	8,79 ^{Da}					8,28 ^{DEFb}	7,68 ^{Gc}
T 84	8,45 ^{Ga}					8,20 ^{FGb}	6,19 ^{Ic}
T 91	8,11 ^{Ha}					8,11 ^{GHa}	4,70 ^{Jb}
T 98	7,77 ^{Ib}					7,99 ^{Ha}	
T 105	7,43 ^{Jb}					7,70 ^{Ja}	
T 112	7,09 ^{Ka}					7,12 ^{Ka}	
T 119	6,75 ^{La}					6,54 ^{Lb}	
T 126	6,41 ^{Ma}					5,96 ^{Mb}	

Médias com letras maiúsculas iguais na mesma coluna e minúsculas iguais na mesma linha não diferiram entre si ($p < 0,05$). T = tempo em dias. ¹Cultivo celular de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 não encapsulado (média de população dos cultivos puros em caldo MRS e em meio de leite), mantido sob refrigeração ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante todo o tempo de experimentação; “A” = Matriz de Alginato de Sódio a 1%; “B” = Matriz de Alginato de Sódio a 2%; “C” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,15% + Tween 80 0,1%; “D” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,15% + Tween 80 0,1% + Inulina 1%; “E” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,26% + Tween 20 0,1%; (Envolvido em Quitosana); “F” = Matriz de Alginato de Sódio 4% + Amido Solúvel 2% (Microencapsulação por Emulsão).

Com base nos resultados apresentados (Tabela1), verifica-se que o microrganismo na sua forma livre, mantido em temperatura de refrigeração, apresentou população de *L. acidophilus* estatisticamente superiores às metodologias testadas ao longo de todo

experimento, exceto nos tempos 35, 91 e 112 dias, em que foi estatisticamente igual ao método “E”, no tempo 49 dias, em que apresentou populações estatisticamente inferiores aos métodos “E” e “F” e nos tempos 98 e 105 dias os valores também foram estatisticamente menores que os encontrados pelo método “E”. Ao longo de 126 dias o microrganismo na forma livre obteve redução de aproximadamente três ciclos logarítmicos (de 9 para 6 \log_{10} UFC/g), sendo que as menores populações, na ordem de 6 \log_{10} UFC/g, só ocorreram nos dois últimos tempos analisados (119 e 126 dias).

O fato de o microrganismo livre ter apresentado melhor resultado que os microrganismos microencapsulados pode ter ocorrido em decorrência de vários fatores, a começar pelas condições de acondicionamento (armazenado em temperatura de refrigeração) que confere uma maior conservação de sua viabilidade, além disso, o caldo MRS e o meio de leite podem ter protegido as células. Ademais, os procedimentos de microencapsulação envolvem etapas que podem ocasionar um estresse celular resultando em alguma perda de viabilidade dos microrganismos microencapsulados, como por exemplo, agitação e lavagem das cápsulas. Soma-se a isso o processo de homogeneização no Homogeneizador de Alimentos (130/1 - Nova Ética), em que as cápsulas são submetidas para liberação das células e posterior determinação de sua viabilidade.

Ainda, com base na Tabela 1, pode-se afirmar que os métodos de microencapsulação “E” e “F” foram capazes de manter a viabilidade do *L. acidophilus* CRL 1014 na ordem de 6 \log_{10} UFC/g, durante 119 e 84 dias, respectivamente, sendo que o método “E” foi capaz de manter a viabilidade do microrganismo em questão com populações estatisticamente superiores ($p < 0,05$) às encontradas pelos demais métodos, exceto nos tempos 21 e 28 dias, onde se observa uma ligeira queda na população, mas que volta a subir no tempo seguinte. Tal fato pode ser explicado por alguma imprecisão inerente ao processo de microencapsulação, onde algumas cápsulas poderiam conter menos células “aprisionadas” do que outras. Vale ressaltar que o microrganismo microencapsulado pelo método “E” permaneceu com população de 8 \log_{10} UFC/g até o 91º dia de estocagem, havendo uma queda de um ciclo logarítmico no tempo 98 dias, permanecendo nessa ordem logarítmica até o tempo 119 dias. Com relação à microencapsulação pelo método “F”, essa foi capaz de manter a viabilidade do probiótico na ordem de 7 \log_{10} UFC/g apenas até o 77º dia.

De maneira geral, pode-se afirmar que o processo de microencapsulação “E” se mostrou bastante eficaz, uma vez que a redução observada até o tempo 112 dias de estocagem do *L. acidophilus* CRL 1014 foi de apenas um ciclo log, condição melhor do que a observada para o controle, onde o microrganismo permaneceu sob refrigeração durante todo o período experimental e a redução foi de 2 ciclos log no período correspondente. Outros estudos também têm mostrado que a sobrevivência de bactérias microencapsuladas foi melhorada em relação às bactérias mantidas na forma livre, durante o período de armazenamento. Koo et al., (2001) relataram que o *L. bulgaricus* YIT 9018 microencapsulado em alginato e revestido com quitosana, como é o caso do método “E” testado no presente estudo, apresentou maior estabilidade de armazenamento em temperatura de 22 °C, do que o cultivo de células livres sob refrigeração.

Tal situação permite afirmar que alguns métodos de microencapsulação se apresentaram como uma alternativa válida ao processo de refrigeração das células livres, no tocante à manutenção da viabilidade do *L. acidophilus* CRL 1014 durante o armazenamento sob temperatura ambiente.

A Tabela 2 refere-se aos resultados da viabilidade do microrganismo *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 microencapsulado pelos métodos “A”, “B”, “C”, “D”, “E” e “F”, mantido em temperatura de refrigeração (5 °C ± 1 °C).

Tabela 2. Viabilidade (\log_{10} UFC/g) dos cultivos celulares de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 microencapsulados (“A”, “B”, “C”, “D”, “E” e “F”) e mantidos em temperatura de refrigeração ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Tempo (dias)	Tratamentos						
	¹ Controle	“A”	“B”	“C”	“D”	“E”	“F”
T 0	9,14 ^{Ba}	8,62 ^{Cb}	8,42 ^{Cc}	8,63 ^{Bb}	8,47 ^{Bc}	8,56 ^{Cbc}	8,41 ^{Dc}
T 7	9,05 ^{BCb}	8,97 ^{Ab}	9,63 ^{Aa}	8,49 ^{Ccd}	8,58 ^{Ac}	8,44 ^{CDd}	8,53 ^{CDcd}
T 14	8,99 ^{Ca}	8,68 ^{Bbc}	8,60 ^{Bd}	8,72 ^{Ab}	8,45 ^{Be}	8,19 ^{FGf}	8,62 ^{BCcd}
T 21	8,73 ^{DEb}	8,57 ^{Dc}	8,27 ^{Ee}	8,37 ^{Dd}	8,29 ^{Cde}	8,08 ^{Gf}	9,12 ^{Aa}
T 28	8,66 ^{EFa}	8,59 ^{Db}	8,24 ^{Fc}	8,31 ^{Ec}	8,01 ^{Dd}	8,24 ^{EFc}	8,53 ^{CDb}
T 35	8,54 ^{FGb}	8,53 ^{Eb}	8,37 ^{Dc}	8,09 ^{Fe}	8,21 ^{Cd}	8,92 ^{Aa}	8,54 ^{CDb}
T 42	8,52 ^{Gab}	8,50 ^{Fb}	8,27 ^{Ec}	8,09 ^{Fe}	8,03 ^{Df}	8,14 ^{FGd}	8,54 ^{CDa}
T 49	8,42 ^{Gb}	8,50 ^{Fb}	8,29 ^{Ec}	7,78 ^{Ge}	7,21 ^{Ef}	8,11 ^{Gd}	8,63 ^{BCa}
T 56	9,40 ^{Aa}	8,03 ^{Gc}	7,94 ^{Fc}	7,47 ^{Hd}	6,39 ^{Fe}	8,56 ^{Cb}	8,57 ^{BCb}
T 63	9,35 ^{Aa}	7,56 ^{Hd}	7,61 ^{Gd}	7,16 ^{Ie}	5,57 ^{Gf}	8,35 ^{DEc}	8,52 ^{CDb}
T 70	9,13 ^{Ba}	6,15 ^{If}	6,95 ^{Hd}	6,54 ^{Je}		8,69 ^{Bb}	8,54 ^{CDc}
T 77	8,79 ^{Da}	5,68 ^{Je}	5,62 ^{Ie}	5,92 ^{Kd}		7,58 ^{Hlc}	8,59 ^{BCb}
T 84	8,45 ^{Ga}					7,62 ^{Hb}	8,45 ^{CDa}
T 91	8,11 ^{Hb}					7,56 ^{Hlc}	8,64 ^{BCa}
T 98	7,77 ^{Ib}					7,48 ^{Ib}	8,69 ^{Ba}
T 105	7,43 ^{Jb}					6,37 ^{Jc}	8,24 ^{Ea}
T 112	7,09 ^{Kb}					5,26 ^{Kc}	7,94 ^{Fa}
T 119	6,75 ^{Lb}						7,64 ^{Ga}
T 126	6,41 ^{Mb}						7,34 ^{Ha}
T 133	6,07 ^{Nb}						7,04 ^{Ia}
T 140	5,73 ^{Ob}						6,74 ^{Ja}
T 154							6,44 ^L
T 161							5,84 ^M

Médias com letras maiúsculas iguais na mesma coluna e minúsculas iguais na mesma linha não diferiram entre si ($p < 0,05$). T = tempo em dias. ¹Cultivo celular de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 não encapsulado encapsulado (média de população dos cultivos puros em caldo MRS e em meio de leite), mantido sob refrigeração ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante todo o tempo de experimentação; “A” = Matriz de Alginato de Sódio a 1%; “B” = Matriz de Alginato de Sódio a 2%; “C” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,15% + Tween 80 0,1%; “D” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,15% + Tween 80 0,1% + Inulina 1%; “E” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,26% + Tween 20 0,1%; (Envolvido em Quitosana); “F” = Matriz de Alginato de Sódio 4% + Amido Solúvel 2% (Microencapsulação por Emulsão).

Com base na Tabela 2, verifica-se que mais uma vez os métodos de microencapsulação “E” e “F” mostraram-se mais eficientes na proteção do *L. acidophilus* CRL 1014 do que os demais métodos avaliados. O método “E”, em particular, foi capaz de manter a viabilidade na ordem de 6 log₁₀UFC/g até o tempo de 105 dias de estocagem.

É interessante observar que o método “F” manteve a viabilidade do *L. acidophilus* na mesma ordem de grandeza (8 log₁₀UFC/g) durante 105 dias, exceto para o tempo de 21 dias, onde se observa uma elevação de um ciclo log, seguindo com população na ordem de 7 log₁₀UFC/g entre os tempos 112 e 133 dias, e mantendo valores em torno de 6 log₁₀UFC/g até o tempo 154 dias. Constata-se que tal método se mostrou mais eficiente que o método “E” e que todos os demais métodos empregados, superando estatisticamente as populações obtidas pelo microrganismo livre, que se manteve viável, em concentração aceitável, até 133 dias. Além disso, o método de encapsulação “F” apresentou queda de apenas 1 ciclo log até o tempo 133 dias (8 para 7 log₁₀UFC/g), enquanto que o microrganismo livre teve queda de 3 ciclos log nesse mesmo período (9 para 6 log₁₀UFC/g).

O microrganismo encapsulado pela metodologia “D” apresentou a pior viabilidade, tanto em temperatura ambiente (Tabela 1) quanto em temperatura de refrigeração (Tabela 2), com viabilidade adequada apenas até o tempo 42 (6,06 log₁₀UFC/g) e 56 dias (6,39 log₁₀UFC/g), respectivamente.

Um estudo realizado por Lee, Cha e Park (2004) avaliou a viabilidade de *L. bulgaricus* KFRI 673 em sua forma livre e microencapsulada em matriz de alginato de sódio ao longo de 4 semanas de armazenamento a 4 °C e 22 °C. A contagem de células viáveis foi semelhante para o microrganismo livre e encapsulado quando armazenados a 4 °C, sendo que a viabilidade das células livres apresentou queda de 9 para 8 log₁₀UFC/g, enquanto que o microrganismo microencapsulado também apresentou queda de um ciclo log (de 7 para 6 log₁₀UFC/g). Quando acondicionado a 22 °C a população do *L. bulgaricus* livre caiu 3 ciclos log (9 para 6 log₁₀UFC/g), e a viabilidade das cápsulas teve queda de 2 ciclos log (7 para 5 log₁₀UFC/g).

Comparando-se os resultados obtidos por Lee, Cha e Park (2004) com os encontrados em nosso estudo, embora os microrganismos utilizados não tenham sido os mesmos (mas as condições de armazenamento foram semelhantes, no período correspondente, 4 semanas), observou-se que *L. acidophilus* encapsulado e mantido em temperatura ambiente apresentou

queda em sua população para os métodos “A” e “D”, no entanto, nesse período todas as viabilidades foram maiores que $5 \log_{10}\text{UFC/g}$, além disso, o método “F” apresentou queda de 1 ciclo log no tempo 21 dias, com recuperação da viabilidade no tempo 28 dias. Quando acondicionadas sob refrigeração não se observou queda de viabilidade em nenhuma das técnicas de microencapsulação, com populações na ordem de $8 \log_{10}\text{UFC/g}$ durante o período referido. Dessa forma, podemos concluir que os resultados encontrados no presente estudo, nas primeiras 4 semanas, foram melhores quando comparados com os encontrados por Lee, Cha e Park (2004).

O *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 microencapsulado pelos métodos “A”, “B”, “C”, “D”, “E” e “F” foi posteriormente submetido ao processo de liofilização, sendo em seguida, armazenado em temperatura ambiente ($25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Sua viabilidade foi avaliada semanalmente por um período de 161 dias. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Viabilidade (\log_{10} UFC/g) dos cultivos celulares de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 microencapsulados (“A”, “B”, “C”, “D”, “E” e “F”) e liofilizados, mantidos em temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 161 dias.

Tempo (dias)	Tratamentos					
	“A”	“B”	“C”	“D”	“E”	“F”
T 0	9,85 ^{Ba}	9,68 ^{ABc}	9,27 ^{Be}	9,77 ^{Bb}	9,85 ^{Aa}	9,43 ^{Ad}
T 7	9,94 ^{ABa}	9,51 ^{CDc}	9,66 ^{Ab}	9,49 ^{Cc}	9,09 ^{Bd}	9,59 ^{Abc}
T 14	9,63 ^{Db}	9,43 ^{CDc}	9,38 ^{Bd}	9,90 ^{Aa}	8,90 ^{Cf}	9,32 ^{ABe}
T 21	9,75 ^{Ca}	9,39 ^{DEb}	9,02 ^{Cd}	9,08 ^{DEFd}	9,08 ^{Bd}	9,48 ^{Ac}
T 28	9,77 ^{BCa}	9,45 ^{CDb}	8,79 ^{Dd}	9,02 ^{EFc}	8,58 ^{De}	9,07 ^{BCc}
T 35	9,90 ^{ABa}	9,20 ^{Fc}	8,37 ^{Fd}	9,16 ^{Dc}	8,07 ^{Ee}	9,52 ^{Ab}
T 42	9,81 ^{Ba}	9,21 ^{Fb}	8,04 ^{Ge}	9,10 ^{DEc}	7,40 ^{Ff}	8,30 ^{Ed}
T 49	9,98 ^{Aa}	9,62 ^{BCb}	8,54 ^{Ed}	9,15 ^{Dc}	7,26 ^{Ge}	9,08 ^{Bc}
T 56	9,68 ^{CDb}	9,77 ^{Aa}	7,29 ^{Ie}	8,74 ^{Gd}	7,15 ^{Gf}	9,05 ^{BCc}
T 63	9,46 ^{Ea}	9,39 ^{DEa}	7,84 ^{Hd}	8,98 ^{Fb}	6,73 ^{Hle}	8,77 ^{CDc}
T 70	8,21 ^{Gc}	9,29 ^{EFa}	7,87 ^{Hd}	9,14 ^{Db}	6,51 ^{Ie}	9,11 ^{Bb}
T 77	8,53 ^{Fc}	9,38 ^{DEa}	7,21 ^{Id}	8,77 ^{Gb}	6,63 ^{Ie}	8,49 ^{DEc}
T 84	7,57 ^{Id}	9,58 ^{BCa}	6,55 ^{Jf}	8,72 ^{Gb}	6,85 ^{He}	8,22 ^{Ec}
T 91	7,56 ^{Ic}	9,24 ^{EFa}	5,89 ^{Kd}	8,49 ^{Hb}	7,48 ^{Fc}	7,53 ^{Fc}
T 98	7,25 ^{Jd}	9,35 ^{DEFa}		7,87 ^{Ib}	7,36 ^{FGc}	7,15 ^{Ge}
T 105	7,68 ^{Hc}	9,77 ^{Aa}		7,97 ^{Ib}	6,23 ^{Je}	6,82 ^{Hd}
T 112	6,59 ^{Kc}	8,98 ^{Ga}		7,76 ^{JKb}	6,03 ^{Kd}	6,59 ^{Ic}
T 119	6,79 ^{Lc}	8,09 ^{Ja}		7,13 ^{Lb}	5,95 ^{Ke}	6,40 ^{Id}
T 126	6,16 ^{Mcd}	8,53 ^{Ha}		6,21 ^{Mbc}		6,07 ^{Jc}
T 133	5,53 ^{Nc}	8,27 ^{Ia}		5,29 Nd		6,14 ^{Jb}
T 140		7,48 ^{Ka}				6,38 ^{Ib}
T 147		7,26 ^{La}				6,17 ^{Jb}
T 154		6,21 ^{Ma}				5,96 ^{Kb}
T 161		5,16 ^N				

Médias com letras maiúsculas iguais na mesma coluna e minúsculas iguais na mesma linha não diferiram entre si ($p < 0,05$). T = tempo em dias. “A” = Matriz de Alginato de Sódio a 1%; “B” = Matriz de Alginato de Sódio a 2%; “C” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,15% + Tween 80 0,1%; “D” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,15% + Tween 80 0,1% + Inulina 1%; “E” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,26% + Tween 20 0,1%; (Envolvido em Quitosana); “F” = Matriz de Alginato de Sódio 4% + Amido Solúvel 2% (Microencapsulação por Emulsão).

Com base nos resultados apresentados na Tabela 3 pode-se observar que a viabilidade do *L. acidophilus* liofilizado comportou-se de maneira distinta às cápsulas não liofilizadas. Verifica-se que o método “B” foi capaz de manter o microrganismo viável por mais tempo em relação aos demais métodos, 154 dias ($6,21 \log_{10}\text{UFC/g}$), seguido pelo método “F”, 147 dias ($6,17 \log_{10}\text{UFC/g}$) e pelos métodos “D” ($6,21 \log_{10}\text{UFC/g}$) e “A” ($6,16 \log_{10}\text{UFC/g}$) por 126 dias. O método “C” foi o que apresentou a menor capacidade de manter o microrganismo viável ao longo do tempo, apenas por 84 dias de estocagem em temperatura ambiente ($6,55 \log_{10}\text{UFC/g}$), seguido pelo método “E”, que atingiu $6,03 \log_{10}\text{UFC/g}$ no tempo 112 dias.

Um estudo realizado por Oliveira et al. (2007) avaliou a estabilidade de microcápsulas de *L. acidophilus* (LAC 4), secas em atomizador (*spray dryer*), durante estocagem por 120 dias em duas temperaturas: 7 °C e 37 °C. As cápsulas foram produzidas com os agentes encapsulantes pectina e caseína. A população inicial de *L. acidophilus* nas cápsulas mantidas a 37 °C foi em torno de $8 \log_{10}\text{UFC/g}$, apresentando queda de 1 ciclo log no tempo 30 dias, e permanecendo nessa ordem logarítmica até o tempo 90 dias, com nova queda para $6 \log_{10}\text{UFC/g}$ no tempo 120 dias.

Embora a cepa do microrganismo utilizado seja diferente à do nosso estudo e a microencapsulação tenha se dado através de matrizes encapsulantes diferentes, além do método de secagem das cápsulas não ter sido por liofilização e as temperaturas de armazenamento utilizadas terem sido maiores, o estudo citado acima pode ser comparado ao nosso por se tratar de armazenamento de cápsulas secas. Comportamento semelhante foi observado para os métodos “A” e “F”, próximos aos tempos 90 e 120 dias, em que as cápsulas apresentaram populações na ordem de $7 \log_{10}\text{UFC/g}$ (90 dias) e em torno de $6 \log_{10}\text{UFC/g}$ (120 dias), embora todos os métodos tenham partido de uma população inicial em torno de $9 \log_{10}\text{UFC/g}$. O método “B”, por sua vez, só apresentou queda de 1 ciclo log no tempo 112 dias, com nova queda para $7 \log_{10}\text{UFC/g}$ apenas no tempo 140 dias, permanecendo assim por mais duas semanas.

Os resultados apresentados pelo método “D” para o *L. acidophilus*, seja em temperatura ambiente ou sob refrigeração (Tabelas 1 e 2, respectivamente), contrariam alguns dados da literatura que mostram que a presença de prebióticos na matriz da microcápsula torna o método mais eficaz. Tal situação fica clara no estudo realizado por Chen et al. (2005) que teve como objetivo melhorar a microencapsulação de probióticos com

prebióticos. Prebióticos (frutooligossacarídeos - FOS), promotor de crescimento (peptídeo) e alginato de sódio foram utilizados como material de revestimento para microencapsular quatro probióticos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium longum*. A proporção de prebióticos, peptídeo, e alginato de sódio foi otimizada através da metodologia de superfície de resposta, cujos resultados indicaram 1% de alginato de sódio misturado com 1% de peptídeo e 3% FOS como a melhor composição de revestimento. Esses pesquisadores também realizaram um teste de estocagem para entender o efeito dos prebióticos nas microcápsulas de probióticos, tendo sido avaliadas duas cápsulas contendo diferentes concentrações de alginato e a cápsula otimizada no estudo. As cápsulas foram imersas em água estéril, armazenada a 4 °C por 3 meses. A contagem de células viáveis foi determinada a cada 2 semanas. A viabilidade das microcápsulas diminuiu com o aumento do período de armazenamento, no entanto, a população de probióticos para a microcápsula otimizada ainda permaneceu entre 10^5 e 10^6 UFC/g, após o armazenamento de 12 semanas, em contraste com apenas 10^2 a 10^3 UFC/g para as cápsulas sem prebióticos. Eles concluíram dessa forma, que as microcápsulas contendo FOS e peptídeo podem fornecer as fontes de carbono e nitrogênio necessárias para os probióticos microencapsulados durante o armazenamento.

Comparando-se a forma livre e microencapsulada, Chen et al. (2005) também constataram que a viabilidade dos probióticos na forma microencapsulada apresentou populações significativamente melhores que aqueles mantidos na forma livre, durante 16 dias de estocagem a 4 °C.

Nazzaro et al. (2009) encapsularam *Lactobacillus acidophilus* em alginato de sódio, goma xantana e inulina, e verificaram sua capacidade de multiplicar em suco de cenoura e sobreviver ao longo de 8 semanas de armazenamento a 4 °C. Os resultados mostraram que o encapsulamento aumentou significativamente a viabilidade das células durante a fermentação e armazenamento em relação às células livres.

Tal situação demonstra, de certa forma, que o método de microencapsulação a ser utilizado depende, também, do tipo de microrganismo em questão, pois os diferentes microrganismos podem ter seus metabolismos alterados em função do processo de encapsulação, como puderam concluir Hansen et al., (2002).

Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 nos fluidos gastrointestinais simulados

A microencapsulação de microrganismos probióticos tem sido realizada não apenas com o intuito de melhorar a estabilidade e aumentar a viabilidade dos mesmos nos alimentos, durante as etapas de processamento e estocagem, mas também de aumentar sua tolerância às secreções gástricas e intestinais.

O microrganismo *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 foi submetido, nas formas livre e microencapsuladas pelos métodos “A”, “B”, “C”, “D”, “E” e “F”, ao teste de sobrevivência às condições simuladas do trato gastrointestinal, resultados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Sobrevivência às condições gastrointestinais (\log_{10} UFC/g) de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 não encapsulado (controle) e microencapsulado (“A”, “B”, “C”, “D”, “E” e “F”).

Tratamentos	População Inicial	FGS	Taxa de Sobrevivência ao FGS	FIS	Taxa de Sobrevivência ao FIS
Controle ¹	9,47 ^{Aa}	8,92 ^B	94,19	9,36 ^b	98,84
“A”	8,93 ^{Aa}	6,51 ^B	72,90	8,40 ^b	94,06
“B”	8,39 ^{Aa}	6,62 ^B	78,90	8,35 ^a	99,52
“C”	8,90 ^{Aa}	7,04 ^B	79,10	8,58 ^b	96,40
“D”	8,47 ^{Ab}	4,25 ^B	50,18	8,97 ^a	105,90
“E”	8,38 ^{Ab}	8,35 ^A	99,64	8,51 ^a	101,55
“F”	8,06 ^{Ab}	6,58 ^B	81,64	8,82 ^a	109,43

Médias com letras iguais na mesma linha não diferem entre si ($p < 0,05$). Letras maiúsculas para comparação entre população inicial e FGS e letras minúsculas para comparação entre população inicial e FIS. ¹Cultivo celular puro em caldo MRS de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 não encapsulado. FGS= Fluido Gástrico Simulado (120 minutos); FIS= Fluido Intestinal Simulado (180 minutos). “A” = Matriz de Alginato de Sódio a 1%; “B” = Matriz de Alginato de Sódio a 2%; “C” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,15% + Tween 80 0,1%; “D” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,15% + Tween 80 0,1% + Inulina 1%; “E” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,26% + Tween 20 0,1%; (Envolvido em Quitosana); “F” = Matriz de Alginato de Sódio 4% + Amido Solúvel 2% (Microencapsulação por Emulsão).

Os resultados obtidos evidenciaram que o microrganismo na forma livre, submetido ao FGS, apresentou contagens de células viáveis superiores (8,92 \log_{10} UFC/g) às verificadas para os microrganismos microencapsulados, no entanto, apresentou queda de 1 ciclo log

quando comparado à população inicial (9,47 log₁₀UFC/g). Comportamento semelhante foi verificado para a encapsulação “C”, que também apresentou queda de 8,90 para 7,04 log₁₀UFC/g. A encapsulação “E”, por sua vez, foi a que apresentou maior capacidade de proteção frente às condições gástricas, com população de 8,35 log₁₀UFC/g, sem diferir estatisticamente de sua população inicial (8,38 log₁₀UFC/g).

A maior sobrevivência do microrganismo livre frente ao fluido gástrico simulado, embora sua viabilidade tenha tido queda de 1 ciclo log, como mencionado anteriormente, se deve ao fato de se tratar de um microrganismo probiótico, que deve necessariamente, apresentar capacidade de resistir às condições do estômago e colonizar o intestino, mesmo que temporariamente, por meio da adesão ao epitélio intestinal, e assim, exercer suas funções probióticas de inibição do desenvolvimento e multiplicação de patogênicos, através da produção de ácidos orgânicos, bacteriocinas, além da produção de substâncias benéficas ao organismo hospedeiro (BRUNSER e GOTTELAND, 2010; CUMMINGS, 2009; PERCIVAL, 2008; VASILJEVIC e SHAH, 2008). Além disso, a resistência às condições gastrointestinais está muito relacionada à cepa do microrganismo utilizado. Outra questão a ser considerada é que o caldo MRS no qual o microrganismo foi cultivado pode conferir proteção ao mesmo.

Quando submetidos ao FIS, tanto o microrganismo livre quanto os microencapsulados mantiveram o mesmo ciclo log das suas populações iniciais, demonstrando total resistência e adaptação natural a essa condição.

Os métodos “D”, “E” e “F”, quanto submetidos ao fluido intestinal simulado, apresentaram populações estatisticamente superiores às suas populações iniciais (8,97; 8,51 e 8,82 log₁₀UFC/g, respectivamente). Tal fato pode ser explicado também por se tratar de um microrganismo probiótico, e, portanto, adaptado às condições intestinais que foram simuladas neste teste, como por exemplo, condições de pH, temperatura e presença de sais biliares. Tais condições podem ter colaborado para o desenvolvimento e multiplicação do microrganismo testado.

Com base nesses resultados pode-se afirmar que os métodos de microencapsulação “A” e “B”, cujas matrizes encapsulantes são compostas exclusivamente por alginato de sódio, 1 e 2% respectivamente, não conferiram a melhor proteção a esse microrganismo, frente às condições gástricas simuladas, com queda de 2 ciclos log quando comparados aos métodos “C” e “E”, sugerindo que a utilização de uma matriz mais complexa pode proporcionar maior

capacidade protetora ao probiótico. No entanto, tal efeito não foi verificado com relação ao método “D” que também foi constituído de uma matriz complexa e obteve queda de 4 ciclos log em relação à sua população inicial.

Já é sabido que as matrizes de alginato de cálcio são bastante porosas, com difusão rápida e fácil de água e outros fluidos dentro e fora, permitindo entrada do meio para o interior das cápsulas, bem como saída das células microbianas da matriz encapsulante para o meio onde se encontram (GOUIN, 2004; ROCHA; GROSSO, 2006; KUANG; OLIVEIRA; CREAN, 2010).

Os experimentos de Sultana et al. (2000) sobre a sobrevivência de algumas bactérias probióticas, como *L. acidophilus* e *Bifidobacterium infantis*, expostas à alta acidez, na forma livre e microencapsulada, indicaram que a encapsulação dessas cepas não foi eficaz na sua proteção frente a essas condições. A viabilidade do *L. acidophilus*, microencapsulado em alginato de sódio, com 3 horas de incubação em pH 2,0, apresentou uma redução de 5 log₁₀UFC/g. Esses resultados são semelhantes aos encontrados em nosso estudo nos processos “A” e “B”, cuja matriz encapsulante, também formada apenas por alginato, não foi capaz de conferir grande proteção ao microrganismo frente às condições gástricas, no entanto, no estudo citado o *L. acidophilus*, além de não se tratar da mesma cepa utilizada por nós, foi deixado em contato com uma solução de pH baixo por 3 horas, enquanto que em nossos experimentos o tempo do teste do FGS foi de apenas 2 horas.

Sultana et al. (2000) também testaram a sobrevivência de *L. acidophilus*, *B. infantis* e *L. casei* frente à exposição a um extrato de bile (1 e 2%) por 2 a 6 horas. As linhagens de *Lactobacillus* spp. apresentaram decréscimo de 2 ciclos log em relação à população inicial. Esses resultados também divergem dos encontrados em nosso estudo, pois, além de se tratar de cepas diferentes, todos os métodos de microencapsulação empregados e submetidos às condições simuladas do fluido intestinal, com a presença de sais biliares, não apresentaram queda nas populações quando comparados com os valores iniciais.

Em estudo realizado por Sabikhi et al. (2008), uma cultura de *L. acidophilus* LA1, na forma livre e microencapsulada, em uma mistura contendo alginato de sódio, foi testada quanto à sobrevivência em três valores de pH gástrico simulado (1,0, 1,5 e 2,0) e em três intervalos de tempo (1, 2 e 3 horas). O *L. acidophilus* LA1 microencapsulado sobreviveu em

maior número e por mais tempo que o microrganismo na sua forma livre, apresentando redução significativamente menor em todos os níveis experimentais ($p < 0,05$).

Tanto os resultados obtidos por Sabikhi et al. (2008), quanto os encontrados no presente estudo, são concordantes com outros trabalhos descritos na literatura (CHANDRAMOULI et al. ,2004; KIM et al., 2008; KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2004).

Em estudos relativos à resistência às condições simuladas gastrointestinais, mais uma vez observa-se na literatura vantagens da utilização de matrizes mais complexas. *L. acidophilus* 547 microencapsulado em esferas de alginato, posteriormente revestidas com quitosana e alginato de sódio, apresentou maior sobrevivência após incubação sequencial em fluidos gástricos e intestinais simulados (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2004).

Em nosso estudo, o método de microencapsulação “E”, cujas cápsulas de alginato são posteriormente revestidas com solução de quitosana, apresentou maior resistência para o *L. acidophilus* frente ao FGS, confirmando os resultados obtidos por Krasaekoopt, Bhandari e Deeth (2004).

Lee, Cha e Park (2004) estudaram o efeito de micropartículas de alginato revestidas com três tipos de quitosana de diferentes pesos moleculares na sobrevivência de *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 frente aos fluidos gástricos (FGS sem pepsina) e intestinal (FIS sem pancreatina) simulados. Eles verificaram que quando o *L. bulgaricus*, em sua forma livre, foi exposto ao FGS (pH 2,0) por 60 minutos, o microrganismo não sobreviveu, no entanto, análises microbiológicas indicaram que a microencapsulação em alginato melhorou a sua sobrevivência. Quando as duas formas foram submetidas ao FIS (pH 7,4), a população bacteriana foi integralmente protegida. O mesmo comportamento foi observado em nosso estudo para o microrganismo utilizado, uma vez que não houve alteração de ciclo quando submetidos ao FIS.

A comparação dos resultados obtidos com as cápsulas desenvolvidas em nosso estudo e os encontrados na literatura nem sempre é fácil, porque diversas são as estirpes de microrganismos probióticos utilizadas e vários são os meios empregados para simular as condições do trato gastrointestinal. Além disso, não existem protocolos padronizados relativos aos estudos *in vitro* da sobrevivência bacteriana. Entretanto, mais uma vez, fica demonstrado,

que de certa forma, a eficácia do método de microencapsulação depende do microrganismo em questão.

Dessa forma, o presente estudo pôde fornecer informações importantes relativas ao potencial das diversas matrizes encapsulantes em preservar microrganismos probióticos frente às condições gastrointestinais simuladas, mantendo sua viabilidade ao longo do tempo em diferentes ambientes.

As microcápsulas obtidas neste estudo podem ser adaptadas para atender os requisitos das aplicações em diversos tipos de alimentos, com textura e funcionalidades diferentes. O microrganismo probiótico pode ser incorporado em cargas de $9 \log_{10}$ UFC por porção de alimento, tal como exigido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária através da última relação de “Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos” (ANVISA, 2008).

A aplicação dessas cápsulas em produtos não aquosos, provavelmente, seria capaz de manter as bactérias viáveis por um longo período em temperatura ambiente. Entretanto, de acordo com Zayed e Ross (2004) teores mínimos de umidade entre 2,8 e 5,6% são necessários para aumentar a sobrevivência de bactérias durante o período de estocagem.

Conclusão

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que o método “E” foi capaz de manter o microrganismo viável por mais tempo (119 dias) em temperatura ambiente, conferindo proteção adequada frente às condições gastrointestinais simuladas (na ordem de $8 \log_{10}$ UFC/g), provavelmente devido à cobertura de quitosana.

Com relação às cápsulas mantidas sob refrigeração o método “F” foi o que manteve a viabilidade por um período maior (154 dias), proporcionando uma proteção satisfatória frente aos fluidos gastrointestinais simulados.

No entanto, os melhores resultados de viabilidade foram os encontrados para as microencapsulações obtidas através dos métodos “B” (método de extrusão contendo 2% de alginato de sódio) e “F” (método de emulsão) associados à liofilização e mantidos em

temperatura ambiente, podendo-se afirmar que alguns processos de microencapsulação de microrganismos probióticos associados à liofilização são capazes de protegê-los e mantê-los viáveis nessa temperatura ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) por mais tempo, permitindo a incorporação destes em alimentos que não necessitem de refrigeração.

Agradecimentos

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brasil pela concessão da bolsa de doutorado e do auxílio financeiro.

Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 8 dez. 2010.

BRUNSER, O.; GOTTELAND, M. (2010) “Probiotics and Prebiotics in Human Health: An Overview.” In: WATSON, R. R.; PREEDY, V. R. **Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics**, 2010. Elsevier Inc. Academic Press, p. 73-93, 640 p. 1ª edição.

CHANDRAMOULI, V.; KAILASAPATHY, K.; PEIRIS, P.; JONES, M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp in simulated gastric conditions. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 1, p. 27-35, 2004.

CHEN, K. N.; CHEN, M. J.; LIU, J. R.; LIN, C. W.; CHIU, H. Y. Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 260–266, 2005.

CUMMINGS, J. H. Probiotics: better health from ‘good’ bacteria? **British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin**, v. 34, p. 198–202, 2009.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.** Córdoba, Argentina 2001. 34 p. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf.

Acesso em outubro de 2012.

FÁVARO-TRINDADE, C. S. (2011) “Microencapsulação de Probióticos”. In: SAAD, S. M. I.; da CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas.** 2011. São Paulo, SP: Livraria Varela, pp. 239-254, 669 p. 1ª edição.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation *L. acidophilus* & *B. lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. **Milchwissenschaft**, v. 55, n. 9, p. 496-499, 2000.

GBASSI, K. G.; VANDAMME, T.; ENNAHAR, S.; MARCHIONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 103-105, 2009.

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

ROCHA, W.S.; GROSSO, C.R.F. Permeação de solutos de diferentes massas moleculares em matrizes compostas de alginato de cálcio e acetofitalato de celulose. **Sitientibus**, n. 35, p. 125-148, 2006.

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 Microbiology**, v. 19, p. 35–45, 2002.

HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, p. 291-311, 2012.

ISLAM, M. A.; YUN, C. H.; CHOI, Y. J.; CHO, C. S. Microencapsulation of live probiotic bacteria. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 1367-1377, 2010.

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

KOO, S. M.; CHO, Y. H.; HUH, C. S.; BAEK, Y. J.; PARK, J. Y. Improvement of the stability of *Lactobacillus casei* YIT 9018 by microencapsulation using alginate and chitosan. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 11, p. 376-383, 2001.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 737-743, 2004.

KUANG, S. S.; OLIVEIRA, J. C.; CREAN, A. M. Microencapsulation as a tool for incorporating bioactive ingredients into food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, p. 951-968, 2010.

LEE, J. S.; CHA, D. S.; PARK, H. J. Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7300-7305, 2004.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; SADA, A.; ORLANDO, P. Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 3, p. 319-323, 2009.

OLIVEIRA, A. C.; MORETTI, T. S.; BOSCHINI, C.; BALIERO, J. C. C.; FREITAS, O.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, v. 24, n. 7, p. 685-693, 2007a.

PERCIVAL, S. L. Probiotics and the Ageing Gut. In: PERCIVAL, S. L. **Microbiology and Aging: Clinical Manifestations**. Springer, New York, pp. 275-289, 2008.

SABIKHI, L.; BABU, R.; THOMPSON, D. K.; KAPILA, S. Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. **Food Bioprocess Technology**, DOI 10.1007/s11947-008-0135-1, 2008.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - A review. **Appetite**, v. 51, p. 456-467, 2008.

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. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 47-55, 2000.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; **Microbiologia**. 4. ed. 718 p. São Paulo: Atheneu, 2004.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 714-728, 2008.

ZAYED, G.; ROSS, Y.H. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1081-1086, 2004.

Capítulo 3

Avaliação da viabilidade de *Lactobacillus paracasei* CRL 75 microencapsulado, exposto a diferentes temperaturas e submetido às condições simuladas do trato gastrointestinal.

Nadiége Dourado PAULY-SILVEIRA*; Tathiê Paiva IGNÁCIO; Mariana Nougalli ROSELINO; Daniela Cardoso Umbelino CAVALLINI; Larissa Sbaglia CELIBERTO; Roseli Aparecida PINTO; Katia SIVIERI; Graciela Fon't de VALDEZ; Elizeu Antonio ROSSI.

Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Rodovia Araraquara-Jaú, Km1, Araraquara, SP, CP 502, CEP: 14801-902, Brasil. *Autor correspondente: nadifcf@hotmail.com

Abstract

The probiotic microorganisms have been microencapsulated in order to provide greater protection against the adverse conditions during processing and storage of foods. The aim of this study was to evaluate the viability of the probiotic *Lactobacillus paracasei* CRL 75, in free and microencapsulated forms, followed or not by freeze-drying, at room ($25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) and refrigeration ($5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) temperatures, using six different microencapsulation methods based on sodium alginate: five extrusion methods (“A”, “B”, “C”, “D”, and “E”) and one emulsion method (“F”). The method “D” had the prebiotic inulin in its composition and the method “E” was subsequently coated by chitosan solution. The microencapsulation methods were performed by adding 20% of cell culture into solutions of sodium alginate. The capsules were placed in sterile vials, stored at room temperature and refrigeration. The freeze-dried capsules were kept at room temperature. The viability of the microorganism *L. paracasei* was accompanied for 63 days at room temperature and under refrigeration, and for 91 days to the freeze-dried capsules. The microorganisms in free and microencapsulation forms were submitted to survival test into simulated gastrointestinal conditions: simulated gastric fluid (SGF/120 min) and simulated intestinal fluid (SIF/180 min). The results were statistically evaluated ($p < 0.05$). At room temperature the method “E” maintained the viability of the microorganism *L. paracasei* for 56 days, whereas, under refrigeration, the technique “D” kept

the microorganism viable for the same period. The capsules obtained by the freeze-dried “C” method conserved the probiotic viable for 84 days. The counts of the free microorganism submitted to SGF and SIF showed higher viable cell counts than those ones observed from the microencapsulated microorganism by all of the methods, however, the initial count of probiotic also was higher, presenting one log cycle of decline when submitted to SGF. When the microorganism was submitted to SIF no reduction of log cycle was detected for any technique and the “F” method provided greater protection to the probiotic. The survival test showed that the methods “C”, “D” and “E” did not present log cycle decline against the FGS compared to their initial counts, and the “D” method conferred the greatest protection in these conditions. In general, it can be stated that the process of probiotic microencapsulation, when associated to freeze-drying, provides greater protection to this microorganisms, keeping them viable at room temperature, enabling the incorporation of these bacteria in foods that should be stored at this temperature.

Keywords: Lactic acid bacteria, Probiotic, Microencapsulation, Freeze-drying.

Resumo

Os microrganismos probióticos têm sido microencapsulados com a finalidade de conferir maior proteção frente às condições adversas durante o processamento e a estocagem de alimentos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a viabilidade do microrganismo probiótico *Lactobacillus paracasei* CRL 75, nas formas livre e microencapsulada, seguidas ou não de liofilização, em temperaturas ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) e de refrigeração ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), utilizando-se seis diferentes métodos de microencapsulação, à base de alginato de sódio, sendo cinco por extrusão (“A”, “B”, “C”, “D” e “E”) e um por emulsão (“F”). O método “D” continha o prebiótico inulina em sua composição e o método “E” foi posteriormente revestido por quitosana. As microencapsulações foram realizadas com a adição de 20% de cultivo celular às soluções de alginato de sódio. As cápsulas foram acondicionadas em frascos estéreis, armazenadas em temperaturas ambiente e de refrigeração. As cápsulas liofilizadas

foram mantidas em temperatura ambiente. O *L. paracasei* teve sua viabilidade acompanhada por 63 dias, em temperatura ambiente e sob refrigeração, e por 91 dias para as cápsulas liofilizadas. O microrganismo livre e as cápsulas foram submetidos aos testes de sobrevivência às condições simuladas do trato gastrointestinal: fluido gástrico simulado (FGS/120 min) e fluido intestinal simulado (FIS/180 min). Os resultados foram avaliados estatisticamente ($p < 0,05$). Em temperatura ambiente o método de microencapsulação “E” manteve a viabilidade do microrganismo *L. paracasei* por 56 dias, enquanto que sob refrigeração a técnica “D” manteve o microrganismo viável pelo mesmo período. As cápsulas obtidas pelo método “C” e liofilizadas mantiveram o microrganismo viável por 84 dias. As populações do microrganismo livre submetido ao FGS e ao FIS apontaram contagens de células viáveis superiores às verificadas para o microrganismo microencapsulado por todos os métodos, no entanto a população inicial era superior, havendo queda de aproximadamente 1 ciclo log quando foi submetido ao FGS. Quando submetido ao FIS não houve redução da ordem de grandeza para nenhuma técnica e o método “F” demonstrou maior resistência para o probiótico. O teste de sobrevivência apontou que os métodos “C”, “D” e “E” não apresentaram queda de ciclo log frente ao FGS, quando comparados às suas populações iniciais, sendo que o método “D” foi o que apresentou maior proteção nessas condições. De modo geral, pode-se afirmar que o processo de microencapsulação de microrganismos probióticos, quando associado à liofilização, confere maior proteção aos mesmos, mantendo-os viáveis em temperatura ambiente, possibilitando a incorporação destas bactérias em alimentos que devam ser estocados nessa temperatura.

Palavras-chave: Bactérias lácticas, Probióticos, Microencapsulação, Liofilização.

Introdução

O consumo de alimentos funcionais tem aumentado nos últimos anos, pois os mesmos além de serem fontes de nutrientes também agem como promotores de saúde e bem-estar, auxiliando na redução do risco de diversas doenças (SIRÓ et al., 2008).

Dos microrganismos benéficos usados tradicionalmente na fermentação, os probióticos têm atraído a atenção de pesquisadores em todo o mundo, por estarem relacionados ao tratamento e prevenção da diarreia, à diminuição dos sintomas da intolerância à lactose, à redução do colesterol sérico, à estimulação da resposta imune e à redução da incidência de tumores (BRUNSER; GOTTELAND, 2010; ROSSI et al., 2011; SAAD; BEDANI; MAMIZUKA, 2011; SIVIERI et al., 2008).

Os microrganismos probióticos, descritos como sendo “microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001), devem necessariamente sobreviver às condições adversas do trato gastrointestinal, atingir o intestino em quantidade suficiente para colonizá-lo, mesmo que temporariamente, por meio da adesão ao epitélio intestinal, e produzir substâncias antimicrobianas que possam impedir o desenvolvimento de patógenos. Além disso, não devem possuir capacidade de translocação (BRUNSER e GOTTELAND, 2010).

A escolha adequada de alimentos para a veiculação de microrganismos probióticos é fundamental para o desenvolvimento de novos produtos. Tradicionalmente a administração desses microrganismos é realizada através de produtos de origem láctea, no entanto, atualmente, há uma tendência crescente de desenvolvimento de novos produtos de veiculação, particularmente os de origem vegetal. Por outro lado, a viabilidade das culturas probióticas nos alimentos funcionais deve ser mantida, e para isso, novos sistemas têm sido estudados, na tentativa de proteger esses microrganismos das condições desfavoráveis do meio, durante o processamento, o armazenamento e a passagem pelo trato gastrointestinal após terem sido ingeridos (HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2012; KUANG; OLIVEIRA; CREAN, 2010).

Assim, novas formas de disponibilização têm surgido, como por exemplo, diversas técnicas de microencapsulação com a finalidade de incorporar microrganismos probióticos em alimentos funcionais, fermentados ou não, como forma de proporcionar a eles uma maior estabilidade (FÁVARO-TRINDADE, 2011; HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2012; ISLAM et al., 2010; RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

Diante da procura por novos alimentos que tragam benefícios à saúde, somados aos potenciais efeitos benéficos dos microrganismos probióticos na prevenção de diversas doenças, além da escassez de alimentos mantidos em temperatura ambiente contendo probióticos, pareceu-nos oportuno avaliar seis métodos de microencapsulação, seguidos ou

não de liofilização, quanto à manutenção da viabilidade do microrganismo probiótico *Lactobacillus paracasei* CRL 75.

Material e Métodos

Microrganismo probiótico

Foi utilizada uma cepa de *Lactobacillus paracasei* CRL 75 procedente da coleção de cultivo do Centro de Referência para Lactobacilos - CERELA (S.M. Tucuman, Argentina).

Preparo e manutenção da suspensão probiótica

A cultura lática foi mantida congelada (-80 °C) em um meio composto de leite em pó desnatado Molico (Nestlé, São Paulo, Brasil), reconstituído a 10%, suplementado com 1% de glicose (D Anidra P.A. – A.C.S., Synth, Diadema, Brasil), 0,5% de extrato de levedura (Yeast Extract - Acumedia – Manufacturing, Inc., Baltimore, Maryland, EUA) e 5% de glicerina bidestilada USP (Synth).

O inóculo foi preparado pela transferência de 10% da cultura de manutenção, ativadas em dois meios distintos previamente esterilizados: meio de leite reconstituído a 10% (isento de glicerol) e caldo Lactobacilli MRS (de Man, Rogosa and Sharpe - Acumedia – Manufacturing, Inc., Baltimore, Maryland, EUA), indicado para o cultivo de lactobacilos. A escolha do meio de cultivo foi feita de acordo com a metodologia de microencapsulação empregada. Os meios inoculados foram incubados em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Contagem de células viáveis

O microrganismo utilizado como controle, não encapsulado (células livres), cultivado em meio de leite ou em caldo MRS, dependendo do método a ser avaliado, foi submetido a diluições seriadas em água peptonada fosfatada e posteriormente plaqueado em ágar Lactobacilli MRS (de Man, Rogosa and Sharpe - Acumedia – Manufacturing, Inc., Baltimore, Maryland, EUA), indicado para o gênero lactobacilos, incubado a 37 °C por 48 horas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

A população de lactobacilos nas cápsulas foi determinada após homogeneização das mesmas, na quantidade de 1g de cápsulas para 100 mL de em água peptonada estéril, em Homogeneizador de Alimentos (130/1 - Nova Ética, Produtos e Equipamentos Científica LTDA, Vargem Grande Paulista, Brasil), por 30 minutos, seguida de diluição seriada em água peptonada, partindo para a 3ª diluição, com posterior plaqueamento em profundidade (*pour plate*) em ágar MRS e incubação a 37 °C por 48 horas.

Microencapsulação do probiótico

As microencapsulações foram realizadas adicionando-se 20% de cultivo celular às soluções de alginato de sódio. As cápsulas que foram liofilizadas em Liofilizador ModulyoD Freeze Dryer (Thermo Electron Corporation) foram previamente adicionadas de 5% de glicerina bidestilada USP (Synth) na suspensão de alginato de sódio, como crioprotetor.

Microencapsulação “A”

O microrganismo *L. paracasei* CRL 75 foi extrusado com alginato de sódio de baixa viscosidade (Vetec, Química Fina LTDA, Duque de Caxias, Brasil), em cloreto de cálcio dihidratado (Synth, Diadema, Brasil), de acordo com a metodologia descrita por Fávares-Trindade e Grosso (2000).

Microencapsulação “B”

O probiótico *L. paracasei* CRL 75 foi encapsulado com alginato de sódio de baixa viscosidade (Vetec) em cloreto de cálcio dihidratado (Synth), segundo uma pequena modificação da metodologia proposta por Fávoro-Trindade e Grosso (2000), onde a concentração da solução de alginato de sódio foi aumentada para 2%.

Microencapsulação “C”

A microencapsulação do cultivo celular de *L. paracasei* CRL75 se deu em alginato de sódio de baixa viscosidade (Vetec), caldo MRS (Acumedia), goma xantana (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e Tween 80 (Merck, Darmstadt, Alemanha), seguido de extrusão em cloreto de cálcio dihidratado (Synth), de acordo com metodologia descrita por Kim et al. (2008).

Microencapsulação “D”

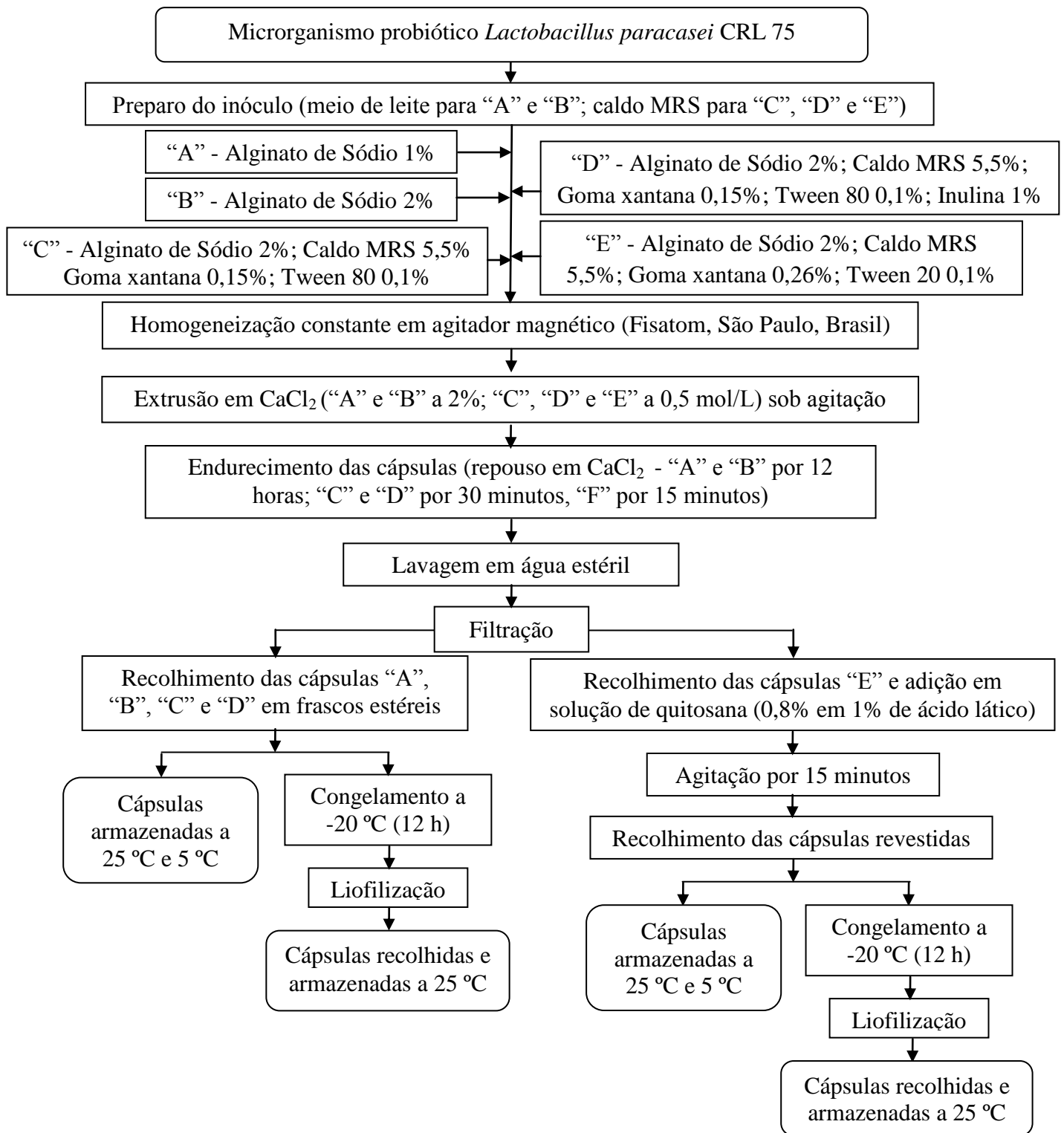
O microrganismo *L. paracasei* CRL 75 foi microencapsulado em alginato de sódio de baixa viscosidade (Vetec), caldo MRS (Acumedia), goma xantana (sigma-Aldrich), inulina Beneo Orafiti[®]GR (Orafiti, Oreye, Bélgica) e Tween 80 (Merck), seguido de extrusão em cloreto de cálcio dihidratado (Synth), de acordo com procedimento descrito por Nazzaro et al. (2009).

Microencapsulação “E”

A microencapsulação do microrganismo *L. paracasei* CRL 75 foi realizada em alginato de sódio de baixa viscosidade (Vetec), caldo MRS (Acumedia), goma xantana (Sigma-Aldrich) e Tween 20 (Merck, Darmstadt, Alemanha), com extrusão em cloreto de cálcio dihidratado (Synth), sendo que as cápsulas foram posteriormente revestidas com uma solução 0,8% de quitosana (Reativa, Araraquara, Brasil) em 1% de ácido láctico (Merck, Darmstadt, Alemanha), segundo procedimento descrito por Lee, Cha e Park (2004).

Um esquema que mostra de maneira resumida e simplificada todos os processos de microencapsulação por extrusão é apresentado na Figura 1.

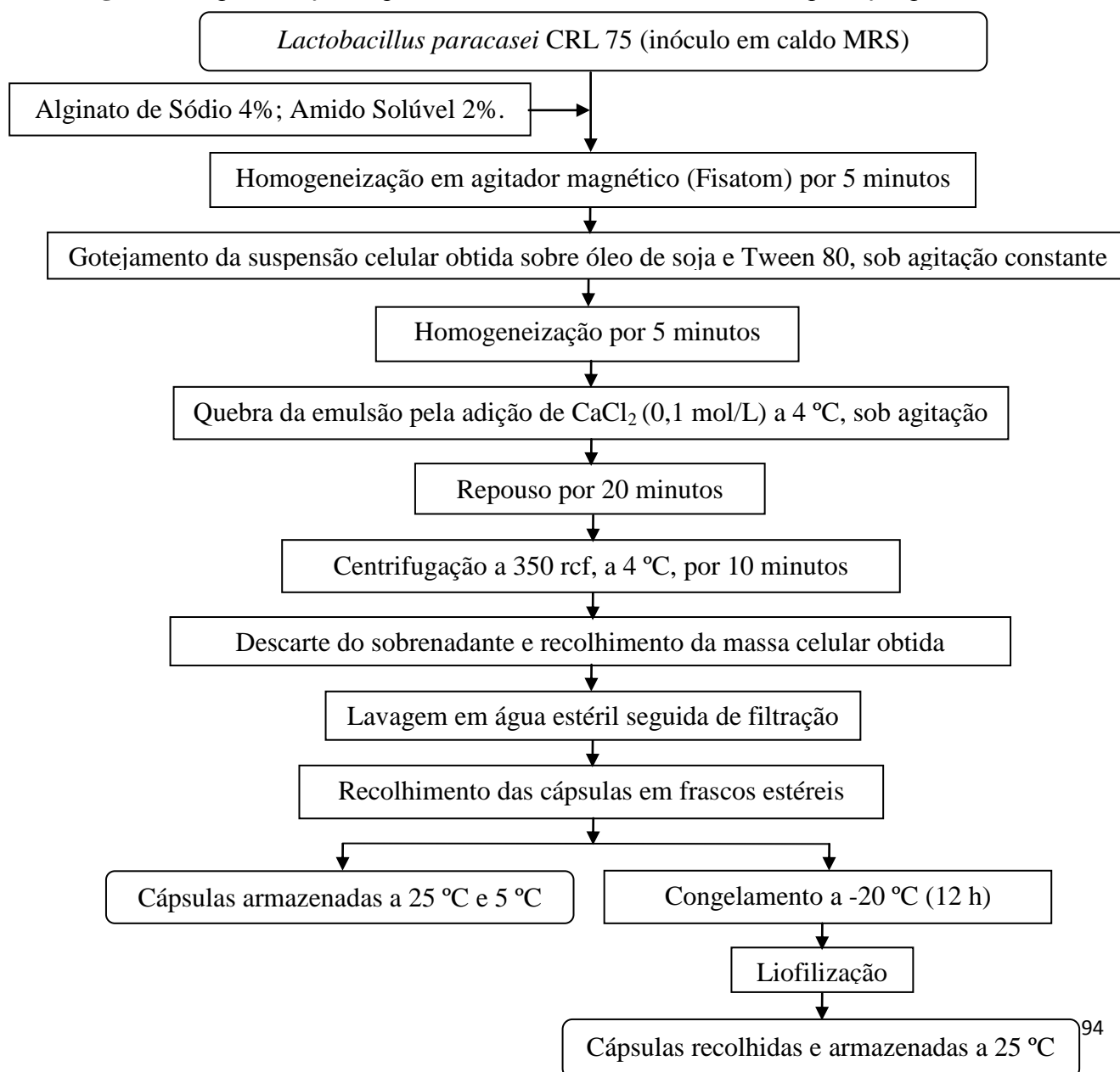
Figura 1. Representação esquemática dos métodos “A”, “B”, “C”, “D” e “E” de microencapsulação por extrusão.



Microencapsulação “F”

A microencapsulação do microrganismo *L. paracasei* CRL 75 pelo método de emulsão foi realizada adicionando-se o probiótico uma mistura de alginato de sódio de baixa viscosidade (Vetec) e amido solúvel (Merck, Darmstadt, Alemanha) em óleo de soja Soya (Bunge, Jaguaré, Brasil) e Tween 80 (Merck), adicionada de cloreto de cálcio diidratado (Synth) e posteriormente centrifugada em Centrífuga Refrigerada Hitachi (modelo CR22GII) e filtrada, de acordo com modificação do procedimento descrito por Sabikhi et al. (2008), por não haver posterior revestimento com ácido esteárico. Um esquema que mostra de maneira simplificada o processo de microencapsulação por emulsão é apresentado na Figura 2.

Figura 2. Representação esquemática do método “F” de microencapsulação por emulsão.



Viabilidade do microrganismo nas microcápsulas

A viabilidade do microrganismo probiótico *Lactobacillus paracasei* CRL 75, tanto na forma livre quanto nas microcápsulas mantidas em temperatura ambiente, de refrigeração e nas microcápsulas liofilizadas mantidas em temperatura ambiente, foram avaliadas semanalmente, por meio de plaqueamento em ágar MRS, por um período variável que foi definido pelo número de células viáveis verificadas, sendo que ao atingir a ordem de $5 \log_{10}$ UFC/g os testes foram encerrados.

Sobrevivência de *Lactobacillus paracasei* CRL 75 aos fluidos gastrointestinais simulados (FGS e FIS)

O microrganismo *L. paracasei* CRL 75 foi submetido, nas formas livre (cultivo em caldo MRS) e microencapsuladas, ao teste de sobrevivência frente às condições simuladas do trato gastrointestinal, segundo metodologia descrita por Gbassi et al., (2009), em que as cápsulas e a suspensão celular do probiótico (cultivo puro em caldo MRS) foram incubadas separadamente em FGS por 120 minutos e em FIS por 180 minutos a 37 °C, sendo posteriormente plaqueadas em profundidade em ágar MRS (Acumedia). O teste de sobrevivência em questão foi executado logo após os inóculos (cultivos puros) e as cápsulas terem sido preparados.

O fluido gástrico simulado (FGS) consistiu de 9 g/L de cloreto de sódio (PA ACS Merck, Darmstadt, Alemanha) contendo 3 g/L de pepsina de mucosa estomacal suína (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), com ajuste de pH para 1,8. O fluido intestinal simulado (FIS) consistiu de 9 g/L de cloreto de sódio (Merck) contendo pancreatina (Sigma-Aldrich) e tripsina de pâncreas bovino (Sigma-Aldrich) na quantidade de 10 g/L cada e 3 g/L de sais biliares (Oxgall, Difco, Sparks, MD, EUA), com ajuste de pH para 6,5 (GBASSI et al., 2009). Os ajustes de pH foram realizados com soluções diluídas de ácido clorídrico (Merck) e hidróxido de sódio (Merck) preparadas em laboratório.

Análise Estatística dos Resultados

Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa BioEstat 5.0, e teste de médias de Tukey. Também foram utilizados os Testes F e T para as análises estatísticas entre duas médias (para o teste de sobrevivência gastrointestinal). As diferenças foram consideradas significativas ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Microencapsulação dos probióticos

A viabilidade do microrganismo *Lactobacillus paracasei* CRL 75, nas formas livre e microencapsuladas pelos métodos “A”, “B”, “C”, “D”, “E” e “F”, foi testada sob duas condições de temperatura: ambiente ($25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) e refrigeração ($5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$), ao longo de 63 dias.

Segundo a relação de alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde adotada pela ANVISA (2008) “a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia.” Diante disso, no presente estudo, admitiu-se $6\text{ log}_{10}\text{UFC/g}$ como a população mínima adequada para a viabilidade do probiótico em estudo, e dessa forma, o acompanhamento dessa viabilidade foi realizado até que as populações atingissem valores na ordem de $5\text{ log}_{10}\text{UFC/g}$, sendo esse, portanto, o valor de corte dos testes de viabilidade. Essa condição explica as diferenças observadas nos tempos de avaliação entre as viabilidades, em temperaturas ambiente e de refrigeração, bem como das cápsulas liofilizadas, para o microrganismo em estudo.

Na Tabela 1 encontram-se os resultados da viabilidade do *Lactobacillus paracasei* CRL 75 microencapsulado pelos métodos “A”, “B”, “C”, “D”, “E” e “F” mantido em temperatura ambiente (25 °C ± 1 °C).

Tabela 1. Viabilidade (log₁₀UFC/g) dos cultivos celulares de *Lactobacillus paracasei* CRL 75 microencapsulados (“A”, “B”, “C”, “D”, “E” e “F”) e mantidos em temperatura ambiente (25 °C ± 1 °C).

Tempo	Tratamentos						
	¹ Controle	“A”	“B”	“C”	“D”	“E”	“F”
T 0	9,89 ^{Aa}	8,69 ^{Cf}	8,77 ^{Ae}	9,24 ^{Ac}	9,01 ^{Ad}	9,31 ^{Bb}	9,28 ^{Ab}
T 7	9,86 ^{Ba}	8,79 ^{Bd}	8,09 ^{Be}	9,01 ^{Bc}	7,58 ^{Bf}	9,61 ^{ABb}	8,09 ^{De}
T 14	9,89 ^{Aa}	8,63 ^{Cc}	8,05 ^{Cd}	7,39 ^{Ce}	7,00 ^{Cf}	8,55 ^{Dc}	8,75 ^{Bb}
T 21	9,86 ^{Ba}	8,98 ^{Ab}	7,24 ^{Dd}	6,44 ^{De}	6,49 ^{Fe}	9,75 ^{Aa}	8,16 ^{Dc}
T 28	9,82 ^{Ca}	8,22 ^{Dd}	6,35 ^{Ef}	6,09 ^{Eg}	6,83 ^{De}	9,42 ^{ABb}	8,48 ^{Cc}
T 35	9,66 ^{Da}	8,31 ^{Dc}	6,24 ^{Ff}	5,86 ^{Fg}	6,66 ^{Ee}	8,56 ^{Db}	7,88 ^{Ed}
T 42	8,94 ^{Ea}	7,89 ^{Eb}	6,09 ^{Gd}		6,65 ^{Ec}	8,97 ^{Ca}	7,89 ^{Eb}
T 49	8,12 ^{Fa}	6,81 ^{Fc}	6,09 ^{Gd}		5,97 ^{Gd}	7,29 ^{Fb}	6,94 ^{Fc}
T 56	7,81 ^{Ga}	5,73 ^{Gd}	5,82 ^{Hc}			7,40 ^{Eb}	5,85 ^{Gc}
T 63	7,50 ^{Ha}					5,65 ^{Gb}	

Médias com letras maiúsculas iguais na mesma coluna e minúsculas iguais na mesma linha não diferiram entre si (p < 0,05). T = tempo em dias. ¹Cultivo celular de *Lactobacillus paracasei* CRL 75 não encapsulado (média de população dos cultivos puros em caldo MRS e em meio de leite), mantido sob refrigeração (5 °C ± 1 °C), durante todo o período experimental. “A” = Matriz de Alginato de Sódio a 1%; “B” = Matriz de Alginato de Sódio a 2%; “C” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,15% + Tween 80 0,1%; “D” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,15% + Tween 80 0,1% + Inulina 1%; “E” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,26% + Tween 20 0,1%; (Envolvido em Quitosana); “F” = Matriz de Alginato de Sódio 4% + Amido Solúvel 2% (Microencapsulação por Emulsão).

Com base nos resultados apresentados na Tabela 1, verifica-se, em linhas gerais, que o microrganismo *Lactobacillus paracasei* CRL 75 na forma de suspensão celular (livre) apresentou população estatisticamente superior (p < 0,05) às encontradas por todas as metodologias de microencapsulação empregadas ao longo de todo período experimental. Vale ressaltar que a viabilidade permaneceu praticamente constante (9 log₁₀UFC/mL) até o tempo 35 dias. A partir daí nota-se uma redução de aproximadamente um ciclo logarítmico no tempo 42 dias e posteriormente nova queda no tempo 56 dias, mantendo-se nessa ordem até o tempo

63 dias. É importante ressaltar que o cultivo celular controle foi mantido em temperatura de 5 °C, enquanto que as microcápsulas, em temperatura ambiente (25 °C ± 1 °C).

Admitindo-se 6 log₁₀UFC/g como a população mínima adequada para um probiótico, verifica-se que a microencapsulação “E” mantida em temperatura ambiente, foi mais eficaz que os demais métodos, uma vez que manteve a população entre 9 e 7 log₁₀UFC/g até o tempo de 56 dias, com redução de 2 ciclos log. Para os outros métodos, nesse mesmo tempo, se observa uma redução de 3 a 4 ciclos log, chegando a uma população abaixo da mínima desejada.

O método “C” foi o que apresentou a menor capacidade de manter o microrganismo *L. paracasei* viável, atingindo 6,09 log₁₀UFC/g no tempo 28 dias, com queda de 1 ciclo log na semana seguinte. O método “D” foi capaz de manter o microrganismo viável por apenas mais 2 semanas, com população em torno de 6 log₁₀UFC/g entre os tempos 21 e 42 dias.

Os resultados apresentados pelo método “D” em temperatura ambiente (Tabela 1) contrariam alguns dados da literatura que mostram que a presença de prebióticos na matriz da microcápsula torna o método mais eficaz. Tal situação é clara no estudo realizado por Chen et al. (2005) que teve como objetivo melhorar a microencapsulação de probióticos com prebióticos. Eles concluíram que as microcápsulas contendo FOS e peptídeos podem fornecer as fontes de carbono e nitrogênio necessárias para os probióticos microencapsulados durante o armazenamento. Comparando-se as formas livre e microencapsulada, Chen et al. (2005) também constataram que a viabilidade dos probióticos na segunda forma conferiu populações significativamente melhores que aqueles mantidos na forma livre, durante 16 dias de estocagem a 4 °C. No entanto, esse grupo de pesquisa não estudou essas variáveis em temperatura ambiente.

O *Lactobacillus paracasei* CRL 75 microencapsulado pelos métodos “A”, “B”, “C”, “D”, “E” e “F” também foi testado em temperatura de refrigeração (5 °C ± 1 °C). Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Viabilidade (\log_{10} UFC/g) dos cultivos celulares de *Lactobacillus paracasei* CRL 75 microencapsulados (“A”, “B”, “C”, “D”, “E” e “F”) e mantidos em temperatura de refrigeração ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Tempo	Tratamentos						
	¹ Controle	“A”	“B”	“C”	“D”	“E”	“F”
T 0	9,89 ^{Aa}	8,69 ^{Af}	8,77 ^{Ae}	9,24 ^{Ac}	9,01 ^{Ad}	9,31 ^{Ab}	9,22 ^{Ac}
T 7	9,86 ^{Ba}	8,69 ^{Ad}	8,64 ^{Be}	7,09 ^{Bg}	9,01 ^{Ac}	7,91 ^{Bf}	9,16 ^{Ab}
T 14	9,89 ^{Aa}	8,31 ^{Bc}	8,42 ^{Cbc}	7,41 ^{Ce}	8,42 ^{Bbc}	7,53 ^{Cd}	8,44 ^{Bb}
T 21	9,86 ^{Ba}	7,66 ^{Dc}	7,82 ^{Db}	6,76 ^{De}	7,09 ^{Cd}	7,12 ^{Dd}	7,69 ^{Cc}
T 28	9,82 ^{Ca}	8,04 ^{Cb}	7,21 ^{Ec}	6,46 ^{Ef}	6,85 ^{Dd}	8,00 ^{Bb}	6,65 ^{De}
T 35	9,66 ^{Da}	8,76 ^{Ab}	6,96 ^{Fc}	6,24 ^{Fe}	6,66 ^{Ed}	7,04 ^{Dc}	6,04 ^{Ef}
T 42	8,94 ^{Ea}	6,78 ^{Fc}	6,27 ^{Ge}	6,12 ^{Gf}	6,65 ^{Ed}	7,40 ^{Cb}	5,91 ^{Eg}
T 49	8,12 ^{Fa}	5,58 ^{Gf}	5,73 ^{He}	6,09 ^{Hd}	6,37 ^{Fc}	6,51 ^{Eb}	
T 56	7,81 ^{Ga}			5,77 ^{Ic}	6,09 ^{Gb}	5,61 ^{Fd}	
T 63	7,50 ^{Ha}				5,81 ^{Hb}		

Médias com letras maiúsculas iguais na mesma coluna e minúsculas iguais na mesma linha não diferiram entre si ($p < 0,05$). T = tempo em dias. ¹Cultivo celular de *Lactobacillus paracasei* CRL 75 não encapsulado (média de população dos cultivos puros em caldo MRS e em meio de leite), mantido sob refrigeração ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), durante todo o período experimental. “A” = Matriz de Alginato de Sódio a 1%; “B” = Matriz de Alginato de Sódio a 2%; “C” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,15% + Tween 80 0,1%; “D” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,15% + Tween 80 0,1% + Inulina 1%; “E” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,26% + Tween 20 0,1%; (Envolvido em Quitosana); “F” = Matriz de Alginato de Sódio 4% + Amido Solúvel 2% (Microencapsulação por Emulsão).

A partir dos resultados apresentados na Tabela 2, verifica-se, como ocorreu para as cápsulas mantidas em temperatura ambiente (Tabela 1), que o microrganismo livre e mantido em temperatura de refrigeração, exibiu populações estatisticamente superiores ($p < 0,05$) às obtidas por todas as microencapsulações empregadas ao longo de todo período, pois, embora as condições de acondicionamento tenham sido as mesmas para o microrganismo livre e as cápsulas ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), os procedimentos de microencapsulação envolvem etapas que podem ocasionar um estresse celular resultando em alguma perda de viabilidade dos microrganismos microencapsulados, como por exemplo, agitação e lavagem das cápsulas. Soma-se a isso o processo de Homogeneização de Alimentos (130/1 - Nova Ética), em que as cápsulas são submetidas para o preparo da diluição seriada e o plaqueamento.

Ao contrário do que foi observado no teste em temperatura ambiente, em temperatura de refrigeração o método “D” contendo o prebiótico inulina mostrou-se como o mais adequado para a manutenção da viabilidade do *L. paracasei*, agora semelhante aos resultados de Chen et al. (2005), indicando que a temperatura de estocagem pode influir na ação do prebiótico presente nas microcápsulas. Este método foi o que se mostrou mais eficaz em termos de manutenção da viabilidade, sendo capaz de manter a população do *L. paracasei* entre 6 e 9 log₁₀UFC/g, ao longo de 56 dias, mostrando redução de 3 ciclos log. No entanto, este método apresentou populações elevadas, variando de 7 a 9 log₁₀UFC/g, apenas até o tempo 21 dias, semelhantemente ao que ocorreu para o método “F” (7,69 log₁₀UFC/g no 21º dia), que continuou viável por apenas mais duas semanas, atingindo 6,04 log₁₀UFC/g ao 35º dia.

O microrganismo microencapsulado pelos métodos “C” e “E” manteve-se viável, com populações entre 6 e 9 log₁₀UFC/g, até 49 dias, também com redução de 3 ciclos log, enquanto os métodos “A” e “B” mantiveram a viabilidade do microrganismo entre 6 e 8 log₁₀UFC/g somente até o 42º dia de estocagem. Entretanto, nesse caso, é válido destacar que as populações iniciais (T 0) das técnicas “A” e “B” foram menores que as observadas para os outros dois métodos. Dessa forma, a redução da população observada até o tempo 49 dias foi de apenas 3 ciclos log, igualando-os aos métodos “C”, “D” e “E” no mesmo período.

O *Lactobacillus paracasei* CRL 75 microencapsulado pelos métodos “A”, “B”, “C”, “D”, “E” e “F” foi submetido ao processo de liofilização e posteriormente armazenado em temperatura ambiente (25 °C ± 1 °C). Sua viabilidade foi avaliada semanalmente por um período de 91 dias. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Viabilidade (\log_{10} UFC/g) dos cultivos celulares de *Lactobacillus paracasei* CRL 75 microencapsulados (“A”, “B”, “C”, “D”, “E” e “F”) e liofilizados, mantidos em temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Tempo	Tratamentos					
	“A”	“B”	“C”	“D”	“E”	“F”
T 0	8,06 ^{Ab}	7,53 ^{Ad}	8,07 ^{Cb}	9,85 ^{Aa}	6,72 ^{Ae}	7,80 ^{Bc}
T 7	8,00 ^{Ab}	6,63 ^{Df}	7,16 ^{Dd}	9,09 ^{Ba}	6,72 ^{Ae}	7,46 ^{Dc}
T 14	8,05 ^{Ab}	6,24 ^{Fe}	8,90 ^{Aa}	8,09 ^{Cb}	6,82 ^{Ad}	7,91 ^{Ac}
T 21	7,27 ^{Cb}	6,85 ^{Cd}	7,19 ^{Dbc}	8,50 ^{Da}	6,13 ^{Ce}	7,16 ^{Dc}
T 28	6,85 ^{Db}	6,13 ^{Gd}	8,48 ^{Ba}	8,49 ^{Da}	6,37 ^{Bc}	6,83 ^{Eb}
T 35	6,26 ^{Ed}	6,45 ^{Ed}	7,30 ^{Db}	7,98 ^{Ca}	5,78 ^{De}	6,87 ^{Ec}
T 42	6,20 ^{Ed}	7,50 ^{Aa}	7,33 ^{Db}	7,34 ^{Db}		6,60 ^{Fc}
T 49	7,54 ^{Ba}	7,31 ^{Bb}	6,85 ^{Ec}	6,70 ^{Ec}		6,24 ^{Gd}
T 56	7,33 ^{Ca}	5,70 ^{Hd}	6,80 ^{Eb}	6,06 ^{Fc}		5,64 ^{Hd}
T 63	6,06 ^{Fb}		6,41 ^{Fa}	5,42 ^G		
T 70	5,90 ^{Gb}		6,77 ^{Ea}			
T 77			6,45 ^F			
T 84			6,14 ^G			
T 91			5,83 ^H			

Médias com letras maiúsculas iguais na mesma coluna e minúsculas iguais na mesma linha não diferiram entre si ($p < 0,05$). T = tempo em dias. “A” = Matriz de Alginato de Sódio a 1%; “B” = Matriz de Alginato de Sódio a 2%; “C” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,15% + Tween 80 0,1%; “D” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,15% + Tween 80 0,1% + Inulina 1%; “E” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,26% + Tween 20 0,1%; (Envolvido em Quitosana); “F” = Matriz de Alginato de Sódio 4% + Amido Solúvel 2% (Microencapsulação por Emulsão).

Apoiado nos resultados apresentados na Tabela 3 observa-se que a viabilidade do *L. paracasei* CRL 75 apresentou-se de modo diferente em relação às cápsulas não liofilizadas. Nota-se que de todos os processos empregados o método “C” foi o que mostrou capacidade de manter por mais tempo (84 dias) a viabilidade do microrganismo (em torno de $6 \log_{10}$ UFC/g) em temperatura ambiente, seguido do “A”. Todos os demais métodos exibiram menor eficiência de manutenção da viabilidade, sendo os métodos “B”, “E” e “F” os piores deles. Vale ressaltar que os três métodos em questão partiram de populações iniciais de *L. paracasei* (T 0) já baixas, em número de 7; 6 e $7 \log_{10}$ UFC/g, respectivamente. É provável que se

tivessem partido de população da ordem de $9 \log_{10}$ UFC/g apresentariam comportamentos diferentes. De qualquer forma, é preciso salientar que o método “B” mostrou redução de aproximadamente 1 ciclo log já no segundo tempo de estocagem, enquanto que o método “E” manteve o microrganismo na população de $6 \log_{10}$ UFC/g até o 28º dia. Essa diferença de comportamento frente às varias técnicas de microencapsulação demonstra, de certa forma, que o metabolismo do microrganismo em estudo pode ter sido alterado em função do processo empregado, como afirmaram Hansen et al., (2002) ao estudarem varias espécies de bifidobactérias microencapsuladas e incorporadas em leite, em que observaram a presença de *off-flavours* após duas das nove espécies microencapsuladas terem sido adicionadas ao leite, uma vez que esses *off-flavours* não foram encontrados nas amostras contendo os referidos microrganismos na forma livre.

Um estudo realizado por Capela, Hay e Shah (2006) avaliou a viabilidade de uma associação de microrganismos probióticos, como *L. acidophilus* 33200, *L. casei* 279, *L. rhamnosus* GG e *Bifidobacterium longum* 536, em iogurte liofilizado durante estocagem por 6 meses a 4, 21 e 37 °C, sendo que a eficácia da microencapsulação dos probióticos, assim como a adição de crioprotectores e prebióticos também foi investigada. Os melhores resultados foram encontrados quando esses microrganismos foram microencapsulados em alginato de sódio com prebiótico e crioprotetor e incorporados no iogurte a ser liofilizado, concluindo que a microencapsulação com alginato aumentou a viabilidade dos microrganismos em 0,31 log em iogurte liofilizado mantido a 21 °C em comparação aos microrganismos não microencapsulados.

Esses resultados, quando comparados aos encontrados no presente estudo, permitem afirmar que alguns métodos de microencapsulação, quando associados ao processo de liofilização, apresentam-se como uma alternativa válida ao processo de refrigeração das células livres, no tocante à manutenção da viabilidade do *L. paracasei* CRL 75.

Sobrevivência de *Lactobacillus paracasei* CRL 75 aos fluidos gastrointestinais simulados

A cepa *Lactobacillus paracasei* CRL 75 foi submetida, nas formas livre e microencapsulada pelos métodos “A”, “B”, “C”, “D”, “E” e “F”, ao teste de sobrevivência às condições simuladas do trato gastrointestinal (Tabela 4).

Tabela 4. Sobrevivência às condições gastrointestinais (\log_{10} UFC/g) de *Lactobacillus paracasei* CRL 75 não encapsulado (controle) e microencapsulado (“A”, “B”, “C”, “D”, “E” e “F”).

Tratamentos	População Inicial	FGS	Taxa de Sobrevivência ao FGS	FIS	Taxa de Sobrevivência ao FIS
Controle ¹	10,03 ^{Ab}	9,12 ^B	90,93	10,14 ^a	101,10
“A”	8,46 ^{Ab}	7,77 ^B	91,84	8,85 ^a	104,61
“B”	8,98 ^{Aa}	7,04 ^B	78,40	8,45 ^b	94,10
“C”	8,59 ^{Aa}	8,40 ^B	97,79	8,06 ^b	93,83
“D”	8,03 ^{Bb}	8,64 ^A	107,60	8,59 ^a	106,97
“E”	8,85 ^{Aa}	8,55 ^B	96,61	8,00 ^b	90,40
“F”	9,48 ^{Aa}	8,28 ^B	87,34	9,23 ^b	97,36

Médias com letras iguais na mesma linha não diferem entre si ($p < 0,05$). Letras maiúsculas para comparação entre população inicial e FGS e letras minúsculas para comparação entre população inicial e FIS. ¹Cultivo celular puro em caldo MRS de *Lactobacillus paracasei* CRL 75 não encapsulado. FGS= Fluido Gástrico Simulado (120 minutos); FIS= Fluido Intestinal Simulado (180 minutos). “A” = Matriz de Alginato de Sódio a 1%; “B” = Matriz de Alginato de Sódio a 2%; “C” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,15% + Tween 80 0,1%; “D” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,15% + Tween 80 0,1% + Inulina 1%; “E” = Matriz de Alginato de Sódio 2% + Caldo MRS 5,5% + Goma Xantana 0,26% + Tween 20 0,1%; (Envolvido em Quitosana); “F” = Matriz de Alginato de Sódio 4% + Amido Solúvel 2% (Microencapsulação por Emulsão).

Os resultados de sobrevivência encontrados para o microrganismo *L. paracasei* CRL 75 na forma livre, submetido ao FGS, apresentou queda de aproximadamente 1 ciclo log em relação à sua população inicial. O mesmo comportamento foi verificado para os métodos “A”, “B” e “F”. Os microrganismos microencapsulados pelas técnicas “C”, “D” e “E” mantiveram a viabilidade na mesma ordem de suas populações iniciais ($8 \log_{10}$ UFC/g). Dentre esses, o

método “D” submetido ao FGS exibiu população estatisticamente superior à sua população inicial.

Comparando-se os métodos, a microencapsulação “D” (8,64 log₁₀UFC/g), seguida pela “E” (8,55 log₁₀UFC/g) e pela “C” (8,40 log₁₀UFC/g), foram as que conferiram maior proteção ao *L. paracasei* frente ao FGS.

Quando o microrganismo *L. paracasei* foi submetido ao fluido intestinal simulado (FIS), todos os métodos de microencapsulação empregados, bem como o microrganismo livre, apresentaram valores na mesma ordem logarítmica de suas populações iniciais.

Pode-se afirmar que os métodos de microencapsulação “A” e “B”, que apresentam matrizes menos complexas, formadas somente por alginato de sódio, não conferiram a melhor proteção ao microrganismo *L. paracasei* frente às condições gástricas simuladas, com queda de 1 ciclo log, atingindo população na ordem de 7 log₁₀UFC/g. O mesmo comportamento foi verificado para o método “F”. Para o método “D” foi verificado um pequeno aumento significativo (0,61 log₁₀UFC/g) na contagem de células viáveis, em relação à população inicial, indicando que a composição da matriz contribuiu positivamente na proteção do microrganismo.

Gbassi et al. (2009) avaliaram a sobrevivência de três cepas de *Lactobacillus plantarum* (Lp299v, LpA159 e Lp800) frente aos mesmos fluidos utilizados em nosso estudo, o FGS e o FIS. A viabilidade dos microrganismos na forma livre submetidos ao FGS por 60 minutos foi de 2,19, 1,89 e 1,65 log₁₀UFC/g, respectivamente, e nenhuma sobrevivência foi observada após 90 minutos, diferentemente ao que ocorreu ao *L. paracasei* CRL 75, frente a essas condições por 120 minutos, que apresentou população de 9,12 log₁₀UFC/g. Tal fato demonstra a resistência natural deste microrganismo, uma vez que, mesmo no estado livre, apresentou redução de aproximadamente 1 ciclo log, quando comparado à sua população inicial. Quando encapsulados, Gbassi et al. (2009) também verificaram redução na viabilidade das três cepas após 60 minutos em FGS (7,76, 6,67 e 5,81 log₁₀UFC/g, respectivamente, a partir de uma população inicial em torno de 10 log₁₀UFC/g). O microrganismo *L. paracasei* também apresentou queda na viabilidade, no entanto, somente para 3 metodologias testadas, e de apenas 1 ciclo log. Entretanto, quando o microrganismo foi submetido ao processo de microencapsulação sua viabilidade inicial reduziu devido ao estresse sofrido pela agitação e pelas perdas na lavagem das cápsulas.

Resultados curiosos foram os obtidos para o microrganismo microencapsulado submetido ao FIS, cujas populações nas cápsulas foram superiores às populações iniciais (métodos “A” e “D” para o *L. paracasei*, Tabela 4), indicando que o ambiente proporcionado pelo fluido intestinal simulado é favorável à multiplicação dessas cepas, uma vez que trata-se de uma espécie probiótica do gênero *Lactobacillus*, ou seja, tem as condições intestinais como adequadas para o seu desenvolvimento.

Um estudo realizado por Kim et al. (2008) avaliou o efeito da microencapsulação na viabilidade de *L. acidophilus* ATCC 43121 frente aos fluidos gastrointestinais simulados em diferentes temperaturas. Eles verificaram que as células não encapsuladas foram completamente destruídas quando expostas ao suco gástrico artificial (pH 1,2 e 1,5), no entanto, que quando microencapsuladas apresentaram queda de células viáveis em 2 ciclos log, atingindo em torno de $5 \log_{10}$ UFC/g após 2 horas de exposição. As células encapsuladas exibiram uma resistência mais elevada ao suco intestinal artificial do que as células livres, inclusive apresentando também população superior às populações iniciais. Eles concluíram que a microencapsulação é uma proteção eficaz aos microrganismos frente ao tratamento com ácido, garantindo o fornecimento das células viáveis para o intestino, sem qualquer efeito adverso significativo sobre as suas funcionalidades.

Comparando os resultados encontrados no presente estudo aos obtidos por Kim et al. (2008), uma vez que o método “C” é o mesmo utilizado pelos pesquisadores citados, e os métodos “D” e “E” são semelhantes, exceto pela presença de inulina e pelo revestimento com quitosana, respectivamente, pode-se dizer que a sobrevivência do *L. paracasei* frente aos fluidos gastrointestinais simulados foi adequada, pois as contagens de células viáveis submetidas aos fluidos FGS e FIS, para os três métodos mencionados, se mantiveram no mesmo ciclo log que a população inicial.

Mandal, Puniya e Singh (2006) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de alginato de sódio (2%, 3% ou 4%) na sobrevivência de *L. casei* NCDC-298 frente ao baixo pH (1,5) e à altas concentrações de sais biliares (1% ou 2%). Eles verificaram que houve uma redução significativa ($p < 0,05$) das células livres de 4 para $3 \log_{10}$ UFC/g ao final de 3 horas de exposição. Após esse período, a maior sobrevivência foi verificada para as cápsulas com 4% de alginato, seguida pelas cápsulas de 3% e de 2%. Dessa forma, eles concluíram que a sobrevivência ao pH baixo da cepa de *L. casei* utilizada melhorou com o aumento da

concentração de alginato. Quando incubaram em sais biliares eles observaram que as células livres decresceram de 9 para 7 log₁₀UFC/g e de 9 para 5 log₁₀UFC/g após 12 horas de exposição nas concentrações de 1% e 2% de sais biliares, respectivamente. A encapsulação em concentrações crescentes de alginato de sódio também melhorou a sobrevivência das células nas concentrações citadas. A viabilidade do *L. casei* diminuiu proporcionalmente com o tempo de exposição aos sais biliares, sendo menos afetada na medida em que se aumentava a concentração de alginato.

No presente trabalho também foi possível observar que a utilização de matrizes encapsulantes mais complexas proporcionou maior capacidade de proteção do *L. paracasei* frente aos fluidos gastrointestinais simulados. No entanto, nossos resultados não estão em concordância com os obtidos em outros estudos, que reportaram que a microencapsulação em alginato não protege completamente os microrganismos frente ao baixo pH ou altas concentrações de sais biliares (FÁVARO-TRINDADE e GROSSO, 2000; HANSEN et al., 2002, SULTANA et al., 2000).

Os resultados de sobrevivência e viabilidade das cápsulas desenvolvidas em nosso estudo nem sempre são facilmente comparados aos encontrados na literatura, pois as cepas de microrganismos probióticos utilizadas são as mais variadas, e diversos são os meios empregados para simular as condições do trato gastrointestinal. Além disso, não existem protocolos padronizados relativos aos estudos *in vitro* da sobrevivência bacteriana. Entretanto, fica demonstrado, que de certa forma, a eficácia do método de microencapsulação depende do microrganismo em questão, além disso, a resistência às condições gastrointestinais é cepa-dependente.

Pode-se dizer que o presente trabalho forneceu informações importantes relativas ao potencial das diversas matrizes encapsulantes em preservar microrganismos probióticos, em particular *L. paracasei* CRL 75 frente às condições gastrointestinais simuladas. Além disso, as cápsulas desenvolvidas neste estudo podem ser melhoradas e adaptadas para atender os requisitos das aplicações em diversos tipos de alimentos não aquosos, com textura e funcionalidades diferentes. Os microrganismos probióticos podem ser incorporados em maior quantidade para que seja atingida a porção diária a ser ingerida, tal como exigido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária através da última relação de “Alimentos com

alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos” (ANVISA, 2008).

Conclusão

Com base nos resultados pode-se concluir que o método “E” foi o mais eficaz na manutenção da viabilidade do microrganismo em temperatura ambiente, além de ter fornecido uma adequada proteção frente às condições gastrointestinais simuladas, provavelmente em decorrência à cobertura de quitosana.

Quando as cápsulas foram acondicionadas sob refrigeração o método “D” foi o que manteve a viabilidade por mais tempo, conferindo apropriada capacidade de sobrevivência frente aos fluidos gastrointestinais simulados.

Contudo, os melhores resultados de viabilidade foram os obtidos pelo método “C” seguido de liofilização e mantidos em temperatura ambiente, o que permite afirmar que o processo de microencapsulação de microrganismos probióticos traz vantagens quanto à proteção, principalmente quando associado à liofilização, mantendo-os viáveis em temperatura ambiente, abrindo, assim, a possibilidade de incorporação destas bactérias em alimentos que devam ser estocados nessa temperatura.

Agradecimentos

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brasil pela concessão da bolsa de doutorado e pelo auxílio financeiro.

Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 8 dez. 2010.

BRUNSER, O.; GOTTELAND, M. (2010) “Probiotics and Prebiotics in Human Health: An Overview.” In: WATSON, R. R.; PREEDY, V. R. **Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics**, 2010. Elsevier Inc. Academic Press, pp. 73-93, 640 p. 1ª edição.

CAPELA, P.; HAY, T. K. C.; SHAH, N. P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yogurt and freeze-yoghurt. **Food Research International**, Amsterdam, v. 39, n. 2, p. 203-211, 2006.

CHEN, K. N.; CHEN, M. J.; LIU, J. R.; LIN, C. W.; CHIU, H. Y. Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 260–266, 2005.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, Argentina 2001. 34 p. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf.

Acesso em outubro de 2012.

FÁVARO-TRINDADE, C. S. (2011) “Microencapsulação de Probióticos”. In: SAAD, S. M. I.; da CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. 2011. São Paulo, SP: Livraria Varela, pp. 239-254, 669 p. 1ª edição.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation *L. acidophilus* & *B. lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. **Milchwissenschaft**, v. 55, n. 9, p. 496-499, 2000.

GBASSI, K. G.; VANDAMME, T.; ENNAHAR, S.; MARCHIONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 103-105, 2009.

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 Microbiology**, v. 19, p. 35–45, 2002.

HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, p. 291-311, 2012.

ISLAM, M. A.; YUN, C. H.; CHOI, Y. J.; CHO, C. S. Microencapsulation of live probiotic bacteria. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 1367-1377, 2010.

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

KUANG, S .S.; OLIVEIRA, J. C.; CREAN, A. M. Microencapsulation as a tool for incorporating bioactive ingredients into food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, p. 951-968, 2010.

LEE, J. S.; CHA, D. S.; PARK, H. J. Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7300-7305, 2004.

MANDAL, S.; PUNIYA, A.K.; SINGH, K. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. **International Dairy Journal**, v.16, p.1190-1195, 2006.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; SADA, A.; ORLANDO, P. Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 3, p. 319-323, 2009.

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

ROSSI, E. A.; CAVALLINI, D. C. U.; MANZONI, M. S. J.; ROSSI, P. R. (2011) “Produtos Probióticos e Prebióticos à Base de Soja.” In: SAAD, S. M. I.; da CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. 2011. São Paulo, SP: Livraria Varela, pp. 541-563, 669 p. 1ª edição.

SAAD, S. M. I.; BEDANI, R.; MAMIZUKA, E. M. (2011) “Benefícios à Saúde dos Probióticos e Prebióticos.” In: SAAD, S. M. I.; da CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. 2011. São Paulo, SP: Livraria Varela, pp. 51-84, 669 p. 1ª edição.

SABIKHI, L.; BABU, R.; THOMPSON, D. K.; KAPILA, S. Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. **Food Bioprocess Technology**, DOI 10.1007/s11947-008-0135-1, 2008.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - A review. **Appetite**, v. 51, p. 456– 467, 2008.

SIVIERI, K.; SPINARDI-BARBISAN, A. L. T.; BARBISAN, L. F.; BEDANI, R.; PAULY, N. D.; CARLOS, I. Z.; BENZATTI, F.; VENDRAMINI, R. C.; ROSSI, E. A. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male Wistar rats. **European Food Research and Technology**, v. 228, p. 231-237, 2008.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; **Microbiologia**. 4. ed. 718 p. São Paulo: Atheneu, 2004.

Capítulo 4

Desenvolvimento de goma de mascar anticariogênica com probiótico microencapsulado

Nadiége Dourado PAULY-SILVEIRA*; Tathiê Paiva IGNÁCIO; Mariana Nougalli ROSELINO; Daniela Cardoso Umbelino CAVALLINI; Larissa Sbaglia CELIBERTO; Roseli Aparecida PINTO; Katia SIVIERI; Graciela Fon't de VALDEZ; Elizeu Antonio ROSSI.

Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Rodovia Araraquara-Jaú, Km1, Araraquara, SP, CP 502, CEP: 14801-902, Brasil. *Autor correspondente: nadifcf@hotmail.com

Abstract

Dental caries is one of the most prevalent chronic diseases in the world population and it is characterized as the main oral disease. Recent researches have suggested that probiotic microorganisms can contribute to oral health by competing with pathogens that are possibly present in that location. Therefore, the present study aimed to the development of chewing gum, no added simple carbohydrates, containing the probiotic *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 microencapsulated by two different methodologies: extrusion (“a”) and emulsion (“b”). The probiotic was tested in vitro for antimicrobial substances production against the *Streptococcus mutans* ATCC 25175. The two probiotic chewing gums, along with a chewing gum without addition of the microorganism (control gum) were evaluated by sensory acceptance test and had the viability of the probiotic in gums weekly tested for 63 and 28 days, respectively. The ability to release probiotics of chewing gums was evaluated by microbiological analysis of five volunteers saliva. The results were statistically evaluated ($p < 0.05$). The test in vitro of antimicrobial substances production showed inhibition of *S. mutans* multiplication by the probiotic, indicating that it is capable of combating cariogenic bacteria. The acceptance test pointed the “b” chewing gum as being more statistically accepted for the attributes appearance, flavor, texture and overall impression. However, the viability of the probiotic microorganism in chewing gum took longer for the “a” gum (63 days) compared to 28 days for the “b” gum. The results of the release test of probiotic from chewing gums into

the mouth showed that the saliva collected over 10 minutes of chewing the probiotic gums presented counts statistically higher than saliva collected at the beginning of the test (control). These results indicated that the microorganism contained in chewing gum trapped in the capsules was released in the mouth, and thus, it may exert its function as a probiotic, since in vitro test the probiotic was able to inhibit the multiplication of oral pathogenic bacteria. It can be concluded that it was possible to develop a chewing gum with anticariogenic potential containing microencapsulated probiotic microorganism which can survive in the gum and be released in the mouth.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014, Microencapsulation, Chewing Gum, Oral Health.

Resumo

A cárie dental é uma das doenças crônicas mais prevalentes na população mundial, caracterizando-se como a principal doença bucal. Pesquisas recentes têm sugerido que os microrganismos probióticos podem contribuir para a saúde bucal, por competirem com os microrganismos patogênicos que possivelmente estejam presentes nesse local. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de gomas de mascar, sem adição de carboidratos simples, contendo o probiótico *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 microencapsulado por duas metodologias distintas: extrusão (“a”) e emulsão (“b”). O probiótico foi testado *in vitro* quanto à produção de substâncias antimicrobianas frente ao *Streptococcus mutans* ATCC 25175. As duas gomas probióticas, juntamente com uma goma de mascar sem a adição do microrganismo (goma controle) foram avaliadas sensorialmente pelo teste de aceitação e as gomas probióticas tiveram a viabilidade do microrganismo testada semanalmente por 63 e 28 dias, respectivamente. A capacidade de liberação do probióticos das gomas de mascar foi avaliada através de análise microbiológica das salivas de cinco voluntários. Os resultados foram avaliados estatisticamente ($p < 0,05$). O teste de produção de substâncias antimicrobianas mostrou inibição da multiplicação *in vitro* do *S. mutans* pelo

probiótico em estudo, indicando que o mesmo é capaz de combater a bactéria cariogênica. O teste de aceitação apontou a goma de mascar “b” como sendo a mais aceita estatisticamente para os atributos aparência, sabor, textura e impressão global. No entanto, a viabilidade do microrganismo probiótico nas gomas de mascar se deu por mais tempo para a goma “a” (63 dias) contra 28 dias para a goma “b”. Os resultados do teste de liberação na boca do microrganismo probiótico das gomas de mascar mostraram que as salivas coletadas ao longo de 10 minutos de mastigação das gomas probióticas apresentaram populações de lactobacilos estatisticamente superiores às salivas coletadas no início do teste (controle). Esses resultados indicaram que o microrganismo contido nas gomas de mascar aprisionado nas cápsulas foi liberado na boca, e dessa forma, pode exercer sua função como probiótico, visto que no teste *in vitro* ele foi capaz de inibir a multiplicação da bactéria patogênica da cavidade oral. Pode-se concluir que foi possível desenvolver uma goma de mascar com potencial anticariogênico, contendo microrganismo probiótico microencapsulado capaz de sobreviver na goma e de ser liberado na boca.

Palavras-chave: *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014, Microencapsulação, Goma de Mascar, Saúde Bucal.

Introdução

Nas últimas décadas evidências científicas têm fortalecido a existência de relação entre uma precária saúde bucal e o desenvolvimento de diversas doenças. Tem sido reconsiderado que a microbiota bucal representa uma ameaça à saúde, podendo atuar como foco de disseminação para a corrente sanguínea de microrganismos com efeitos patogênicos e suas toxinas, podendo desencadear diversas doenças, como doenças cardiovasculares (endocardite e aterosclerose), infecção de próteses articulares, controle metabólico do diabetes, doenças respiratórias, nascimento de prematuros, entre outros (ELLIS et al., 2007; SCANNAPIECO; DASANAYAKE; CHUN, 2010).

As infecções orais constituem algumas das mais comuns e onerosas formas de infecções em seres humanos. Nesse sentido, a bacterioterapia utilizando microrganismos probióticos surge como uma forma alternativa e promissora de combater infecções por microrganismos patogênicos (CILDIR et al., 2009; HAUKIOJA, 2010).

Dos microrganismos benéficos usados tradicionalmente na fermentação, os probióticos têm atraído a atenção de pesquisadores em todo o mundo, por estarem relacionados ao tratamento e prevenção da diarreia, à diminuição dos sintomas da intolerância à lactose, à redução do colesterol sérico, à estimulação da resposta imune e à redução da incidência de tumores (BRUNSER; GOTTELAND, 2010; ROSSI et al., 2011; SAAD; BEDANI; MAMIZUKA, 2011; SIVIERI et al., 2008).

Os probióticos são descritos como sendo “microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001).

Embora os probióticos sejam administrados por via oral, os estudos sobre estes microrganismos com relação à saúde bucal são escassos e seus efeitos sobre a ecologia microbiana oral são ainda pouco conhecidos. Vários estudos clínicos têm demonstrado a existência de uma correlação positiva entre microrganismos probióticos e a saúde bucal (GUPTA, 2011; HAUKIOJA, 2010; PHAM et al., 2009; STAMATOVA; MEURMAN, 2009).

Tanto a manutenção quanto a viabilidade das culturas probióticas nos alimentos funcionais constituem grandes desafios tecnológicos para as indústrias que buscam sistemas que sejam capazes de proteger esses microrganismos das condições desfavoráveis do meio, durante o processamento, o armazenamento e a passagem pelo trato gastrointestinal após terem sido ingeridos (HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2012; KUANG; OLIVEIRA; CREAN, 2010). Nesse sentido, propostas de microencapsulação têm sido apresentadas por alguns pesquisadores e junto com elas vários métodos já foram avaliados com a finalidade de incorporar microrganismos probióticos em alimentos funcionais, fermentados ou não, como forma de conferir a eles uma maior estabilidade (FÁVARO-TRINDADE, 2011; HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2012; ISLAM et al., 2010).

A seleção de alimentos adequados para a administração de probióticos é um fator fundamental que deve ser considerado para o desenvolvimento de novos produtos probióticos.

Tradicionalmente, a veiculação desses microrganismos era realizada através de produtos lácteos, no entanto, atualmente, há uma tendência crescente de desenvolvimento de novos produtos. Também se observa a disponibilização dos probióticos em cápsulas e microcápsulas, possibilitando novas formas de apresentação dos mesmos, apesar de excluir o potencial efeito sinérgico com o alimento (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

As gomas de mascar podem ser utilizadas como veículos para agentes preventivos e/ou terapêuticos, com base nisso elas têm sido estudadas e utilizadas como veículos de uma gama de substâncias como cálcio, bicarbonato, clorexidina, flúor e polióis, como o xilitol, além de carrear substâncias medicinais como a nicotina, aspirina, anti-histamínicos, agentes antifúngicos, cafeína e vitaminas (LY; MILGROM; ROTHEN, 2008). Recentemente a goma de mascar tem sido utilizada como veículo para os microrganismos probióticos, para que sejam liberados na cavidade oral, onde possam exercer seus efeitos benéficos (ÇAGLAR et al., 2007; KELLER et al., 2012; TWETMAN et al., 2009).

Diante dos potenciais efeitos benéficos dos microrganismos probióticos na prevenção de diversas doenças, da escassez de produtos contendo probióticos voltados para um efeito na microbiota oral, pareceu-nos oportuno desenvolver uma nova goma de mascar isenta de carboidratos, contendo o microrganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 microencapsulado.

Material e Métodos

Microrganismo probiótico

Foi utilizada uma cepa de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 procedente da coleção de cultivo do Centro de Referência para Lactobacilos - CERELA (S.M. Tucuman, Argentina).

Preparo e manutenção da suspensão probiótica

A cultura lática foi mantida congelada (-80 °C) em um meio composto de leite em pó desnatado Molico (Nestlé, São Paulo, Brasil), reconstituído a 10%, suplementado com 1% de glicose (D Anidra P.A. – A.C.S., Synth, Diadema, Brasil), 0,5% de extrato de levedura (Yeast Extract - Acumedia – Manufacturing, Inc., Baltimore, Maryland, EUA) e 5% de glicerina bidestilada USP (Synth).

O inóculo foi preparado pela transferência de 10% da cultura de manutenção, ativado em dois meios distintos previamente esterilizados: meio de leite reconstituído a 10% (isento de glicerol) e caldo Lactobacilli MRS (de Man, Rogosa and Sharpe - Acumedia – Manufacturing, Inc., Baltimore, Maryland, EUA). A escolha do meio de cultivo foi feita de acordo com a metodologia de microencapsulação empregada. Os meios inoculados foram incubados em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Microencapsulação do probiótico

As microencapsulações foram realizadas adicionando-se 20% de cultivo celular às soluções de alginato de sódio.

Microencapsulação “a” (microencapsulação por extrusão)

O probiótico *L. acidophilus* CRL 1014, na concentração de 20% de inóculo em meio de leite, foi encapsulado com alginato de sódio de baixa viscosidade (Vetec, Química Fina LTDA, Duque de Caxias, Brasil) em cloreto de cálcio dihidratado (Synth, Diadema, Brasil), de acordo com uma pequena modificação da metodologia proposta por Fávaro-Trindade e Grosso (2000), sendo que no presente trabalho foi utilizada a concentração de 2% de alginato de sódio, ao invés de 1%, sendo que as cápsulas foram posteriormente liofilizadas.

Microencapsulação “b” (microencapsulação por emulsão)

A microencapsulação do microrganismo *L. acidophilus* CRL 1014 pelo método de emulsão foi realizada utilizando 20% de inóculo em caldo MRS, adicionado em alginato de sódio de baixa viscosidade (Vetec) e amido solúvel (Merck, Darmstadt, Alemanha) em óleo de soja Soya (Bunge, Jaguaré, Brasil) e Tween 80 (Merck, Darmstadt, Alemanha), adicionada de cloreto de cálcio e posteriormente centrifugada em Centrífuga Refrigerada Hitachi (modelo CR22GII) e filtrada, de acordo com modificação do procedimento descrito por Sabikhi et al. (2008), uma vez que no presente trabalho as cápsulas não foram revestidas com ácido esteárico, além disso, foram seguidas de liofilização.

Produção de substâncias antimicrobianas

Com o intuito de verificar a produção de substâncias antimicrobianas foi utilizada a técnica *spot-on-the-law* segundo metodologia descrita por Barros et al. (2009). No presente estudo foi verificada a produção de substâncias antagônicas pelo probiótico *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 frente ao microrganismo patogênico *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

A presença de halo de inibição, ao redor de cada ponto, indica a produção de substâncias antimicrobianas pelo microrganismo avaliado, podendo incluir as bacteriocinas.

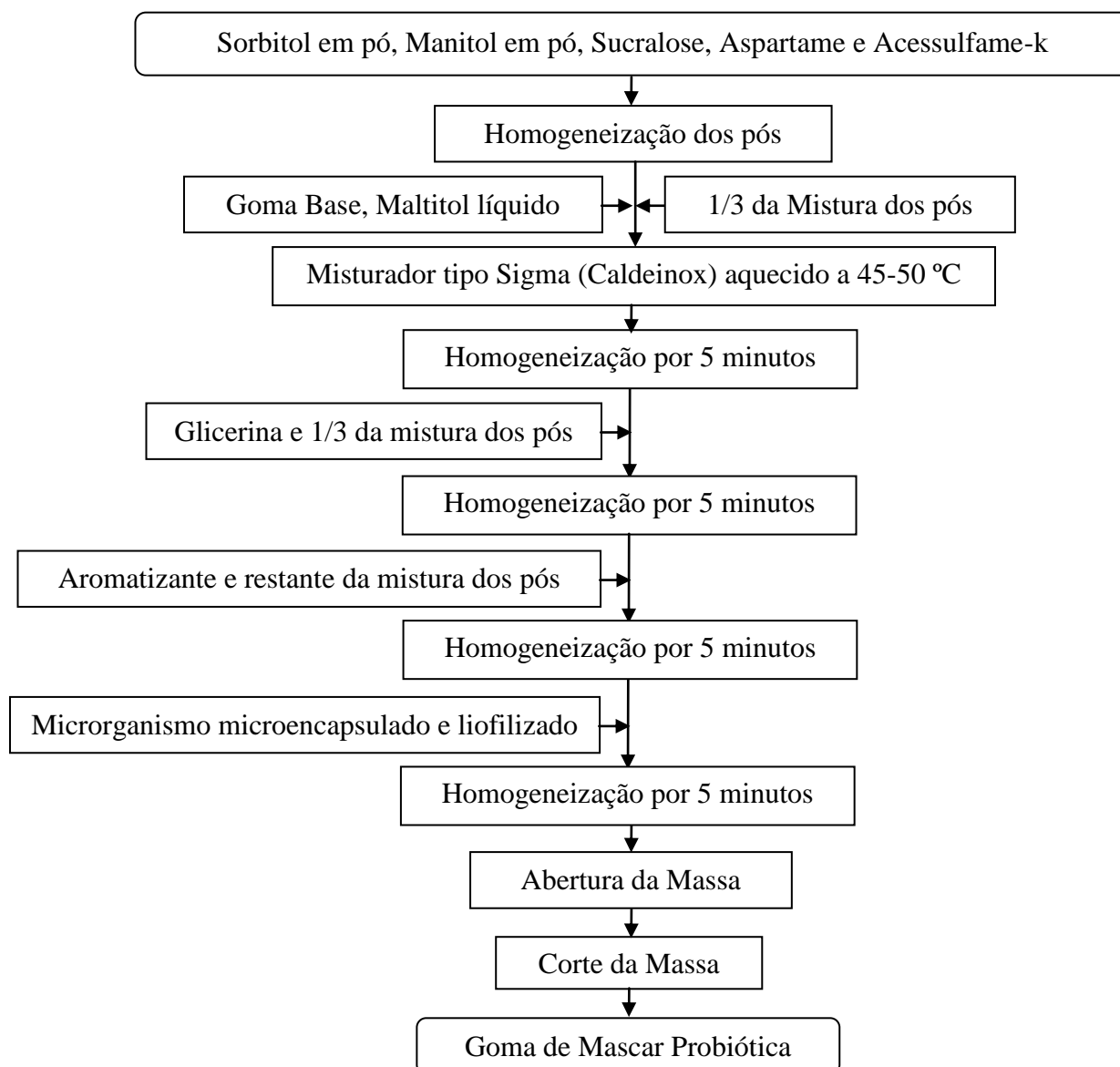
Desenvolvimento das gomas de mascar probióticas

As gomas de mascar sem adição de carboidratos simples e contendo o microrganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 microencapsulado pelos métodos “a” e “b” foram desenvolvidas separadamente a partir da Goma Base (Proaroma, Diadema, Brasil) de acordo com indicações do fabricante, na proporção de 30%, adicionada de 0,50% de glicerina bidestilada USP (Synth, Diadema, Brasil), 2,40% de aroma idêntico ao natural de hortelã (Proaroma, Diadema, Brasil), 5% de manitol em pó (Synth, Diadema, Brasil), 8% de maltitol

líquido (Lycasin[®] 80/55 by Roquette America Inc. at Food, Beverage & Nutrition), 53,32% de sorbitol em pó (Labonathus Healthy Solutions, São Paulo), 0,10% de sucralose (Tovani Benzaquen Ingredientes, São Paulo, Brasil), 0,10% de aspartame (Tovani Benzaquen Ingredientes) e 0,08% de acessulfame-k (Tovani Bensaquen Ingredientes) (POTINENI; PETERSON, 2008). Uma goma de mascar sem adição de probiótico microencapsulado também foi desenvolvida, sendo utilizada como controle. Todos os componentes mencionados possuíam grau alimentício.

O esquema representado na Figura 1 mostra de maneira simplificada o processo de produção da goma de mascar probiótica.

Figura 1. Representação esquemática da formulação da goma de mascar probiótica.



Viabilidade do microrganismo probiótico nas gomas de mascar

A viabilidade de *L. acidophilus* CRL 1014 nas gomas de mascar foi determinada homogeneização das mesmas em água peptonada fosfatada estéril, em Homogeneizador de Alimentos (130/1 - Nova Ética, Produtos e Equipamentos Científica LTDA, Vargem Grande Paulista, Brasil), por 30 minutos, para que as cápsulas se rompessem e liberassem o microrganismo, seguida de diluição seriada em água peptonada, plaqueamento em profundidade em ágar Lactobacilli MRS (de Man, Rogosa and Sharpe - Acumedia – Manufacturing, Inc., Baltimore, Maryland, EUA) e incubação a 37 °C por 48 horas. A amostragem do teste microbiológico das gomas de mascar probióticas foi realizada sob duas formas, tomando-se 1 g de goma em 100 mL de água peptonada e 25 g de goma em 250 mL de água peptonada, sendo que não houve diferença entre as amostragens do ponto de vista microbiológico. A viabilidade do microrganismo probiótico *L. acidophilus* CRL 1014 nas gomas de mascar foi avaliada semanalmente até que o microrganismo atingisse uma população em torno de $2 \log_{10}$ UFC/g.

Avaliação sensorial das gomas de mascar probióticas

A avaliação sensorial das gomas de mascar controle, “a” e “b” foi realizada através do teste de aceitação, utilizando-se 50 consumidores não treinados, aplicando-se escala hedônica estruturada de nove pontos (9 = gostei muitíssimo; 5 = não gostei nem desgostei e 1 = desgostei muitíssimo), com relação aos atributos aparência, cor, sabor, textura e impressão global (STONE; SIDEL, 2004). A avaliação da atitude de compra foi realizada segundo Meilgaard, Carr e Civille (2007), através de escala de intenção de compra de cinco pontos (1 = certamente não compraria; 5 = certamente compraria o produto).

O teste foi realizado em cabines individuais providas de abastecimento de água filtrada e cuspidouro, com suficiente iluminação natural e artificial, instaladas em laboratório apropriado para a finalidade em questão e com a aprovação do Comitê de Ética local (Protocolo CEP n^o 25/2009).

As gomas de mascar foram submetidas ao teste sensorial na semana seguinte de seus respectivos processamentos, estando, portanto, com armazenamento máximo de 7 dias.

Capacidade de liberação do microrganismo probiótico na boca

Dos voluntários dos testes sensoriais, cinco foram orientados a fornecerem saliva estimulada naturalmente para ser utilizada como controle. Em seguida as salivas procedentes da mastigação das gomas de mascar contendo o microrganismo probiótico foram coletadas ao longo de 10 minutos sem deglutição, com as seguintes modificações das metodologias descritas por Moreira (2006) e Moura et al. (2008): saliva estimulada naturalmente foi utilizada para a coleta da saliva controle, ao invés da utilização de um pedaço de látex, além disso, a mastigação foi realizada ao longo de 10 min ao invés de 5 min. Vale ressaltar que as coletas das salivas foram realizadas em dias diferentes para cada goma de mascar probiótica. As amostras de saliva foram submetidas a análises de viabilidade dos microrganismos probióticos presentes nas gomas de mascar, através de diluições seriadas em água peptonada e posteriormente plaqueamento em ágar MRS, indicado para o gênero *Lactobacillus*, incubado a 37 °C, em anaerobiose, por 48 horas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004), com o intuito de verificar a capacidade de liberação dos mesmos das microcápsulas.

Os voluntários foram instruídos a excretar a saliva dentro de um recipiente plástico esterilizado para este fim. Após homogeneização, 1 mL da saliva foi diluído em 9 mL de água peptonada fosfatada para seguir com a análise microbiológica a partir da primeira diluição (10^{-1}) (MOREIRA, 2006; MOURA et al., 2008).

Análise Estatística dos Resultados

Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa BioEstat 5.0, e ao teste de médias de Tukey. Também foram utilizados os Testes F e

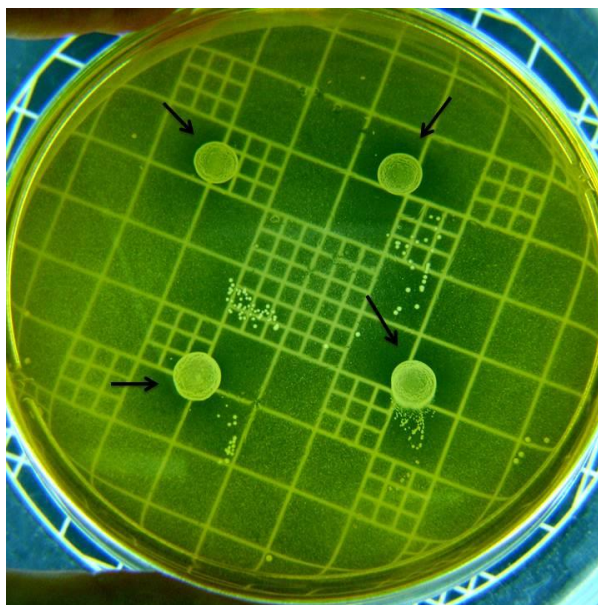
T para as análises estatísticas entre duas médias. As diferenças foram consideradas significativas ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Produção de substâncias antimicrobianas

Na Figura 2 está apresentado o resultado observado no teste de produção de substâncias antimicrobianas, nas quais podem estar incluídas as bacteriocinas, pelo cultivo de *L. acidophilus* CRL 1014 frente à bactéria cariogênica *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Figura 2. Teste de produção de substâncias antimicrobianas produzidas pelo *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014, representas pela formação de halos de inibição à multiplicação do *Streptococcus mutans* ATCC 25175.



Placa de ágar MRS contendo pontos de *L. acidophilus* CRL 1014 com sobrecamada de BHI semissólido contendo *S. mutans* ATCC 25175. As setas indicam formação de halo ao redor dos pontos de inoculação do probiótico.

Com base nesse resultado observa-se que o microrganismo probiótico em estudo produziu substâncias antimicrobianas, pois foi capaz de inibir a multiplicação *in vitro* do *S. mutans*, uma vez que é notável o aparecimento de halos ao redor dos pontos de inoculação do probiótico. Essa condição de inibição do microrganismo cariogênico aponta a possibilidade de utilização dessa cepa em produtos voltados para a saúde oral.

Esses resultados *in vitro*, observados no presente estudo, vão de encontro com diversos trabalhos da literatura. Estudos clínicos têm sugerido que espécies de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. podem exercer efeitos benéficos na cavidade oral pela inibição tanto de espécies de *Streptococcus* spp. cariogênicos quanto de *Candida* spp. (HAUKIOJA, 2010; MEURMAN, 2005; TWETMAN; STECKSEN-BLICKS, 2008). Além disso, vários outros estudos mostraram que os microrganismos probióticos pertencentes ao gênero *Lactobacillus* spp. têm apresentado diversas atividades inibitórias *in vitro* contra diferentes patógenos orais (KELLER et al., 2011; KÖLL-KLAIS et al., 2005; MADHWANI; McBAIN, 2011; STAMATOVA; MEURMAN, 2009).

Tem sido considerado que o papel benéfico dos probióticos se deva principalmente ao seu efeito inibitório sobre os agentes patogênicos. Essa atividade pode ser devido à competição por sítios de ligação com patógenos ou à produção de substâncias antimicrobianas. Os probióticos além de produzirem ácido lático podem produzir também peróxido de hidrogênio, outros ácidos orgânicos, diacetil, substâncias antimicrobianas de baixo peso molecular, bacteriocinas e inibidores de adesão, podendo restringir a multiplicação de uma ampla gama de patógenos (COLLADO; MERILUOTO; SALMINEN, 2007; MEURMAN, 2005).

Viabilidade do microrganismo probiótico nas gomas de mascar

As gomas de mascar probióticas desenvolvidas no presente estudo foram submetidas a testes microbiológicos semanais com o intuito de verificar a viabilidade do microrganismo *L. acidophilus* incorporado nas mesmas. Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Viabilidade (\log_{10} UFC/g) do microrganismo *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 microencapsulado pelos métodos “a” e “b”, incorporados nas gomas de mascar.

Tempo (dias)	Gomas de Mascar	
	Goma de mascar “a”	Goma de mascar “b”
T 0	6,15 ^a	6,99 ^a
T 7	5,90 ^b	5,96 ^b
T 14	5,23 ^d	4,75 ^c
T 21	5,58 ^c	3,73 ^d
T 28	4,51 ^e	2,54 ^e
T 35	4,83 ^e	
T 42	4,93 ^{d,e}	
T 49	4,41 ^e	
T 56	3,68 ^e	
T 63	2,40 ^f	

Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ($p < 0,05$). T = tempo em dias. Viabilidade nas cápsulas “a” = 8,48 \log_{10} UFC/g (antes de serem incorporadas na goma de mascar). Viabilidade nas cápsulas “b” = 8,82 \log_{10} UFC/g (antes de serem incorporadas na goma de mascar). “a” = Matriz de Alginato de Sódio a 2% (Microencapsulação de *L. acidophilus* CRL 1014 por Extrusão); “b” = Matriz de Alginato de Sódio 4% + Amido Solúvel 2% (Microencapsulação de *L. acidophilus* CRL 1014 por Emulsão).

De acordo com a Tabela 1 observa-se que ambas as gomas de mascar “a” e “b” apresentaram população inicial de probiótico na ordem de 6 \log_{10} UFC/g. Para desenvolver as gomas de mascar as cápsulas de ambos os métodos foram incorporadas na ordem de 8 \log_{10} UFC/g (conforme legenda da Tabela 2). Em decorrência do volume de goma de mascar a ser produzido em cada lote, considerando-se a capacidade volumétrica do equipamento, já se esperava uma redução em torno de 2 ciclos log devido à quantidade de cápsulas a serem adicionadas em relação à quantidade total de matéria-prima, pois para que se mantivesse a população encontrada nas cápsulas iniciais haveria a necessidade de incorporar uma quantidade 10 vezes maior de cápsulas liofilizadas, quantidade que não seria possível de se produzir em escala laboratorial. Por isso, pode-se deduzir que o processo em si de elaboração das gomas de mascar não afetou a viabilidade inicial do probiótico empregado.

Verifica-se que ambas as gomas tiveram queda de 1 ciclo log já na primeira semana, no entanto a goma de mascar “b” continuou a apresentar quedas de 1 ciclo log por semana, atingindo a ordem de 2 \log_{10} UFC/g no tempo 28 dias. A goma de mascar “a” manteve a

população na ordem de 5 log₁₀UFC/g até o tempo 21 dias, caindo para 4 log₁₀UFC/g e mantendo nessa logarítmica até o tempo 49 dias, com quedas nas duas semanas subsequentes, atingindo 2,40 log₁₀UFC/g no tempo 63 dias.

Esses resultados não eram esperados devido ao excelente comportamento das cápsulas “a” e “b” liofilizadas e mantidas em temperatura ambiente, que foram capazes de manter o microrganismo *L. acidophilus* CRL 1014 viável e com população na ordem de 6 log₁₀UFC/g por 154 e 147 dias, respectivamente (resultados ainda não publicados). Tal situação se deve, provavelmente, às condições adversas da matriz da goma que continha aromatizante em base alcoólica. Apesar do excelente comportamento dessas cápsulas fora de uma matriz alimentícia, fica claro que quando adicionadas à goma, tal comportamento fica prejudicado, exigindo, assim, a busca de uma nova proteção para essas cápsulas, as quais sejam capazes de resistirem, por exemplo, ao aromatizante em base alcoólica utilizado no processamento. Vale ressaltar que as cápsulas produzidas pelo método “b” foram as mais afetadas, certamente por se tratar de um método de emulsificação, o qual foi mais facilmente desestabilizado pela presença do álcool.

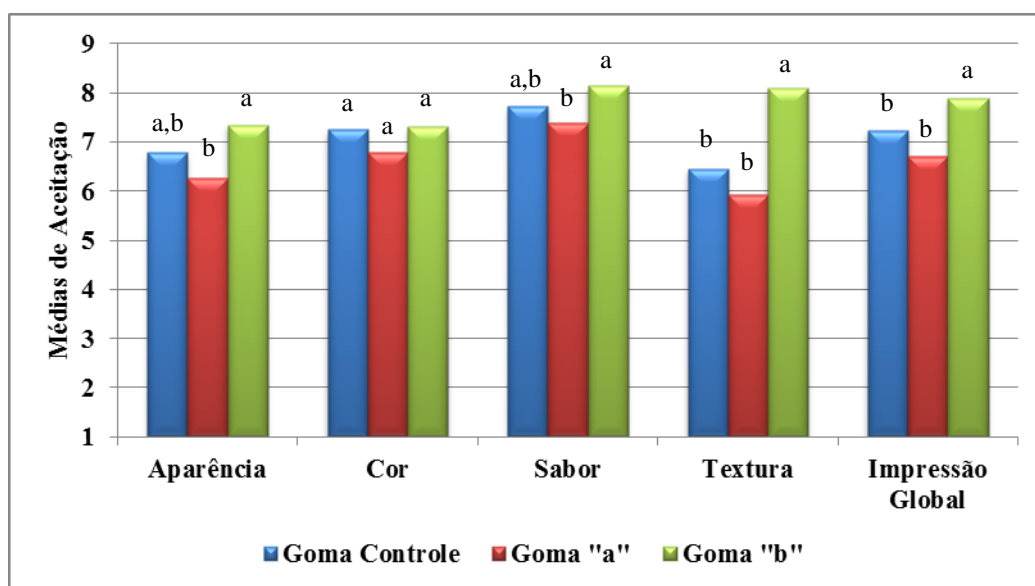
Sabe-se que as cápsulas de alginato de cálcio são porosas, facilitando o fluxo de fluidos para dentro e fora das cápsulas. Soma-se a isso o fato de que o método de emulsão dá origem a cápsulas muito menores que as da extrusão, aumentando a superfície que entrará em contato com a matriz da goma, e principalmente com o aromatizante alcoólico, podendo levar os microrganismos à morte em um período mais curto de tempo que as cápsulas de extrusão. Além disso, segundo Shue, Marshall e Heymann (1993) e Lee e Heo (2000), quanto menor o tamanho das cápsulas, mais rápida a difusão dos fluidos através das mesmas. Ainda segundo esses autores, cápsulas maiores e com maior concentração de alginato de sódio origina cápsulas menos porosas, além de poros menores, dificultando a difusão de glicose e etanol, testados por eles.

Avaliação sensorial das gomas de mascar probióticas

As gomas de mascar contendo o microrganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 microencapsulado pelos métodos “a” e “b” foram submetidas à avaliação sensorial

por meio do teste de aceitação com relação a cinco atributos sensoriais: aparência, cor, sabor, textura e impressão global. Além das duas gomas probióticas, uma goma de mascar controle, isenta de cápsulas probióticas, também foi avaliada. Os resultados das médias de aceitação estão ilustrados na Figura 3.

Figura 3. Representação gráfica das médias de aceitação das gomas de mascar controle, “a” e “b”.



Médias com letras minúsculas iguais no mesmo atributo não diferiram entre si ($p < 0,05$). $n=50$ julgadores (escala de 0 a 9 correspondendo de desgostei muitíssimo a gostei muitíssimo). Goma de mascar controle = sem adição de microrganismo probiótico; Goma “a” = Matriz de Alginato de Sódio a 2% (Microencapsulação de *L. acidophilus* CRL 1014 por Extrusão); Goma “b” = Matriz de Alginato de Sódio 4% + Amido Solúvel 2% (Microencapsulação de *L. acidophilus* CRL 1014 por Emulsão).

De acordo com a Figura 3, pode-se perceber que as médias de aceitação das 3 gomas de mascar foram relativamente altas, todas entre 6 e 8, o que significa que a aceitabilidade dos consumidores estiveram entre os escores 6 (“gostei ligeiramente”) e 8 (“gostei muito”).

Com relação ao atributo aparência, nota-se que a goma de mascar contendo as cápsulas de emulsão (“b”) apresentou médias de aceitação estatisticamente igual à goma controle e estatisticamente superior ($p < 0,05$) à goma “a”, no entanto essa não diferiu do controle. O mesmo resultado foi observado para o atributo sabor.

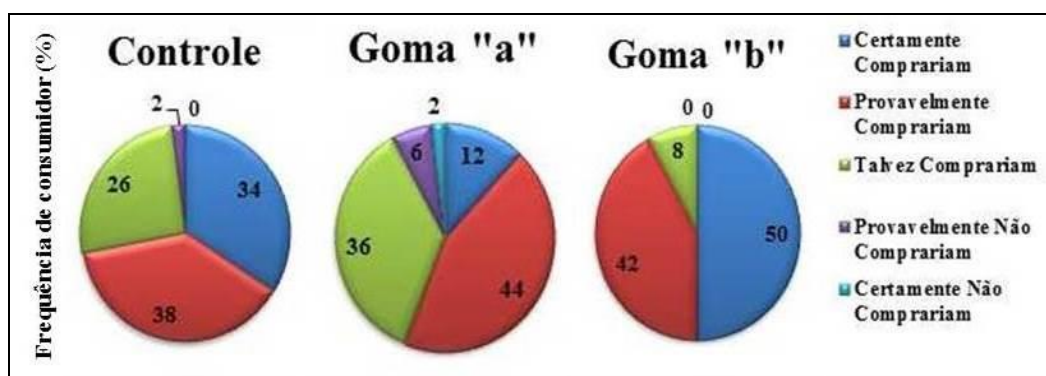
Os atributos textura e impressão global apresentaram médias de aceitação estatisticamente superiores para a goma “b” com relação às gomas controle e “a”, que por sua vez tiveram médias estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

O atributo “cor” foi o único para o qual não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as três gomas.

Pode-se observar, portanto, que a goma de mascar contendo as cápsulas processadas pelo método de emulsão “b” foi a que apresentou os melhores resultados de um modo geral.

A Figura 4 ilustra a frequência de consumidores referentes à intenção de compra para as três gomas de mascar avaliadas.

Figura 4. Representação gráfica da frequência de consumidores (%) referente à intenção de compra.



Goma controle = sem adição de microrganismo probiótico; Goma “a” = Matriz de Alginato de Sódio a 2% (Microencapsulação de *L. acidophilus* CRL 1014 por Extrusão); Goma “b” = Matriz de Alginato de Sódio 4% + Amido Solúvel 2% (Microencapsulação de *L. acidophilus* CRL 1014 por Emulsão).

Com base na Figura 4 observa-se que para a goma de mascar “b” a grande maioria dos julgadores respondeu que certamente e provavelmente comprariam o produto, totalizando 92% de aceitação, não havendo nenhuma resposta nos itens de negação (provavelmente e certamente não comprariam) e somente 8% apresentaram dúvida com relação à atitude de compra do mesmo.

A goma de mascar controle apresentou 72% de respostas de aceitação, sendo que 26% dos julgadores declararam estar em dúvida e apenas 2% não comprariam o produto, enquanto que para a goma de mascar “a” os julgadores apontaram uma aceitação de 56%, com 36% de dúvida e 8% afirmaram que não comprariam o produto.

Esses resultados de atitude de compra mostram que houve coerência com os resultados das médias do teste de aceitação, apontando a goma de mascar “b” como a mais bem aceita, seguida pela goma controle e por último pela goma de mascar “a”.

Essa menor aceitação pela goma de mascar “a” já era de certa forma esperada, pois as cápsulas oriundas da extrusão são maiores que as cápsulas obtidas pelo método de emulsão, e em decorrência disso, essas cápsulas eram visíveis na goma de mascar, e por certo influenciou negativamente na aceitação por parte dos julgadores.

Fávaro-Trindade (2011) afirmou que, de maneira geral, quanto menor o tamanho da partícula, mais fácil o escoamento e a dispersão no alimento. Da mesma forma que quanto maior o tamanho da partícula maior seu efeito prejudicial na textura do alimento, o que pode explicar as médias de aceitação mais baixas da goma de mascar “a” para os atributos textura e conseqüentemente impressão global.

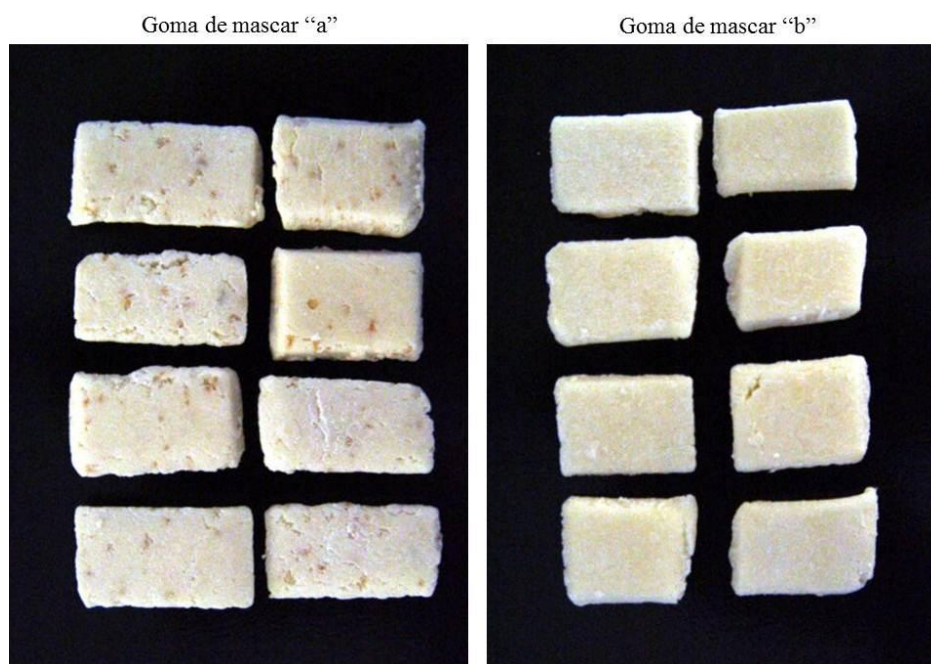
Imai et al. (1999) também observaram que a presença de partículas grandes pode ser indesejável na maioria dos alimentos, exceto em algumas circunstâncias onde é desejável que o consumidor possa vê-las, como é o caso de muitos alimentos destinados ao público infantil.

No presente estudo o teste de aceitação foi realizado por julgadores adultos. Se a goma de mascar “a” fosse apresentada ao público infantil para o teste de aceitação, provavelmente os resultados poderiam ter sido diferentes e talvez fossem de encontro com a afirmação feita por Imai et al. (1999), principalmente se essas cápsulas passassem por um processo de coloração.

Em contraste, a maior aceitação obtida pela goma de mascar “b” provavelmente foi devido ao método de encapsulação empregado, que segundo Fávaro-Trindade (2011) o método de emulsão é vantajoso à medida que se obtém cápsulas bem pequenas, macias e arredondadas, o que facilita sua dispersão nos alimentos e reduz o efeito na textura, tornando-as praticamente imperceptíveis quando consumidas através de um produto alimentício.

Na Figura 5 são apresentadas fotografias das duas gomas de mascar probióticas avaliadas no teste sensorial.

Figura 5. Gomas de mascar probióticas “a” e “b” avaliadas no teste de aceitação.



Goma “a” = Matriz de Alginato de Sódio a 2% (Microencapsulação de *L. acidophilus* CRL 1014 por Extrusão); Goma “b” = Matriz de Alginato de Sódio 4% + Amido Solúvel 2% (Microencapsulação de *L. acidophilus* CRL 1014 por Emulsão).

Capacidade de liberação do microrganismo probiótico na boca

As amostras de saliva dos voluntários que mascaram as gomas de mascar probióticas “a” e “b” foram avaliadas quanto à população de *Lactobacillus* spp. com o intuito de verificar se houve liberação do probiótico dessas gomas. Os resultados estão apresentados na Tabela 2. As gomas utilizadas nesse teste haviam sido processadas há no máximo 7 dias.

Tabela 2. População (\log_{10} UFC/g) de *Lactobacillus* spp. liberados na saliva a partir das gomas de mascar “a” e “b”, durante mastigação por 10 minutos.

Tratamentos	Goma de Mascar “a”		Goma de Mascar “b”	
	Saliva Controle	Saliva Teste	Saliva Controle	Saliva Teste
Voluntário 1	5,04 ^b	6,86 ^a	5,38 ^b	6,95 ^a
Voluntário 2	5,96 ^b	8,10 ^a	5,49 ^b	7,64 ^a
Voluntário 3	5,32 ^b	6,86 ^a	5,59 ^b	6,49 ^a
Voluntário 4	5,77 ^b	7,42 ^a	5,57 ^b	7,36 ^a
Voluntário 5	4,95 ^b	6,76 ^a	4,58 ^b	7,99 ^a

Médias com letras iguais na mesma linha, para cada goma de mascar, não diferem entre si ($p < 0,05$). Goma “a” = Matriz de Alginato de Sódio a 2% (Microencapsulação de *L. acidophilus* CRL 1014 por Extrusão); Goma “b” = Matriz de Alginato de Sódio 4% + Amido Solúvel 2% (Microencapsulação de *L. acidophilus* CRL 1014 por Emulsão). Saliva Controle: saliva com estimulação natural; Saliva Teste: saliva após mastigação das gomas de mascar probióticas por 10 minutos.

De acordo com a Tabela 3 verifica-se que a população de lactobacilos para as salivas teste das duas gomas de mascar (“a” e “b”) foram maiores estatisticamente ($p < 0,05$) para todos os voluntários, quando comparadas com a população de lactobacilos nas salivas controle (saliva estimulada naturalmente) indicando que provavelmente o microrganismo probiótico contido nas cápsulas de ambas as gomas foi liberado das mesmas. Entretanto, é necessário ressaltar que o número de lactobacilos liberado foi baixo, variando de 1 a 3 \log_{10} UFC, uma vez que na saliva controle foi detectado um número considerável de células viáveis de bacilos. Provavelmente o tempo de mastigação não foi o suficiente para o rompimento total das cápsulas, com consequente liberação dos microrganismos.

Embora não satisfatórios, esses resultados aliados aos anteriores de produção de substâncias antibacterianas pelos probióticos, indicam que o produto desenvolvido neste trabalho possui potencial como produto probiótico e, particularmente, anticariogênico, pois além do *L. acidophilus* CRL 1014 ser capaz de inibir *in vitro* a multiplicação da bactéria cariogênica *S. mutans*, o mesmo estava viável nas gomas de mascar e foi liberado na boca de voluntários após mastigação das mesmas. É evidente que numa próxima etapa ajustes deverão

ser feitos, tanto no processo de encapsulação quanto no de produção das gomas, para que resultados mais expressivos possam ser observados.

Nota-se ainda que os aumentos dos valores na população de lactobacilos nas salivas teste em relação às do controle foram de 1, 2 e até 3 ciclos log. Essas diferenças de população entre os voluntários e gomas pode ser em decorrência de uma imprecisão inerente ao processamento da goma de mascar, ou da diferença na quantidade de cápsulas contidas em cada unidade das gomas, ou da diferença na quantidade de microrganismos contidos nas cápsulas, ou, ainda, de uma homogeneização não muito uniforme, pois após as cápsulas serem adicionadas à goma base a homogeneização no Misturador Tipo Sigma (Caldeinox – Indústria e Comércio LTDA, Bauru, Brasil) não deve ultrapassar 5 minutos, de forma que os microrganismos não sofram com a elevação da temperatura e com o atrito. Somam-se a isso as possíveis diferenças fisiológicas entre os voluntários, como composição da saliva, fluxo salivar, diferentes estruturas bucais, dentre outras.

De acordo com a lista de alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde adotada pela ANVISA (2008) “a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia.” Dessa forma, outra questão a se considerar é a possibilidade da administração dessas gomas de mascar ocorrer por mais de uma vez ao dia, condição que poderia proporcionar um efeito cumulativo de microrganismos probióticos na boca, e ao longo do tempo poderia ser capaz de aderir e colonizar esse ambiente, mesmo que temporariamente, exercendo seus efeitos probióticos nesse local. Além disso, não se sabe ao certo qual seria a quantidade mínima necessária de microrganismos probióticos liberados na boca para que o produto seja considerado potencialmente anticariogênico. Para isso, estudos clínicos devem ser realizados com a administração dessas gomas para que se possa afirmar se quantidades inferiores às recomendadas para efeito sistêmico ou no intestino (10^6 UFC/g) são capazes de exercer efeito benéfico local, especificamente na cavidade oral.

Conclusões

As gomas de mascar incorporadas das cápsulas “a” e “b” apresentaram boa aceitação sensorial, bem como expressiva intenção de compra por parte dos julgadores. Além disso, verificou-se que o microrganismo incorporado nas gomas resistiu às várias etapas do processamento e à posterior estocagem do produto em temperatura ambiente, sendo em seguida liberado na boca, e dessa forma, podendo, provavelmente, exercer sua função como probiótico, com ação anticariogênica, visto que no teste *in vitro* ele foi capaz de inibir a multiplicação do *S. mutans*.

Agradecimentos

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brasil pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro a este estudo com a concessão do auxílio à pesquisa.

Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 8 dez. 2010.

BARROS, M. R.; ANDREATTI FILHO, R. L.; LIMA, E. T.; CROCCI, J. A. Avaliação *in vitro* da atividade inibitória de *Lactobacillus* spp., isolados do inglúvio e cecos de aves sobre *Salmonella*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 4, p. 863-868, 2009.

BRUNSER, O.; GOTTELAND, M. (2010) "Probiotics and Prebiotics in Human Health: An Overview." In: WATSON, R. R.; PREEDY, V. R. **Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics**, 2010. Elsevier Inc. Academic Press, pp. 73-93, 640 p. 1ª edição.

ÇAGLAR, E.; KAVALOGLU, S. C.; KUSCU, O. O.; SANDALLI, N.; HOLGERSON, P. L.; TWETMAN, S. Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli. **Clinical Oral Investigations**, v. 11, p. 425-429, 2007.

CILDIR, S. K.; GERMEC, D.; SANDALLI, N.; OZDEMIR, F. I.; ARUN, T.; TWETMAN, S.; ÇAGLAR, E. Reduction of salivary mutans streptococci in orthodontic patients during daily consumption of yoghurt containing probiotic bacteria. **The European Journal of Orthodontics**, v. 31, p. 407-411, 2009.

COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: *In vitro* evaluation of different methods. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, p. 71-74, 2007.

ELLIS, J. S.; AVERLEY, P. A.; PRESHAW, P. M.; STEELE, J. G.; SEYMOUR, R. A.; THOMASON, J. M. Change in cardiovascular risk status after dental clearance. **British Dental Journal**, v. 202, n. 9, p. 543-544, 2007.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, Argentina 2001. 34 p. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf.

Acesso em outubro de 2012.

FÁVARO-TRINDADE, C. S. (2011) "Microencapsulação de Probióticos". In: SAAD, S. M. I.; da CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. 2011. São Paulo, SP: Livraria Varela, pp. 239-254, 669 p. 1ª edição.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation *L. acidophilus* & *B. lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. **Milchwissenschaft**, v. 55, n. 9, p. 496-499, 2000.

GUPTA, G. Probiotics and periodontal health. **Journal of Medicine and Life**, v. 4, n. 4, p. 387-394, 2011.

HAUKIOJA, A. Probiotics and oral health. **European Journal of Dentistry**, v. 4, p. 348-355, 2010.

HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, p. 291-311, 2012.

IMAI, E.; SAITO, K.; HATAKEYAMA, M.; HATAE, K.; SHIMADA, A. Effect of physical properties of food particles on the degree of graininess perceived in the mouth. **Journal of texture Studies**, v. 30, p. 59-88, 1999.

ISLAM, M. A.; YUN, C. H.; CHOI, Y. J.; CHO, C. S. Microencapsulation of live probiotic bacteria. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 1367-1377, 2010.

KELLER, M. K.; HASSLÖF, P.; STECKSÉN-BLICKS, C.; TWETMAN, S. Co-aggregation and growth inhibition of probiotic lactobacilli and clinical isolates of mutans streptococci: An *in vitro* study. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 69, p. 263-268, 2011.

KÖLL-KLAIS, P.; MÄNDAR, R.; LEIBUR, E.; MARCOTTE, H.; HAMMARSTRÖM, L.; MIKELSAAR, M. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: Species composition and antimicrobial activity. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, p. 354-361, 2005.

KUANG, S. S.; OLIVEIRA, J. C.; CREAN, A. M. Microencapsulation as a tool for incorporating bioactive ingredients into food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, p. 951-968, 2010.

LEE, K. Y.; HEO, T. R. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 869-873, 2000.

LY, K. A.; MILGROM, P.; ROTHEN, M. The potential of dental-protective chewing gum in oral health interventions. **The Journal of the American Dental Association**, v. 139, n. 5, p. 553-563, 2008.

MADHWANI, T.; McBAIN, A. J. Bacteriological effects of a *Lactobacillus reuteri* probiotic on *in vitro* oral biofilms. **Archives of Oral Biology**, v. 56, p. 1264-1273, 2011.

MEILGAARD, M. C.; CARR, T.; CIVILLE, G. **Sensory evaluation techniques**. 4th ed. New York: CRC Press, 2007.

MEURMAN, J. H. Probiotics: Do they have a role in oral medicine and dentistry? **European Journal of Oral Sciences**, v. 133, n. 3, p. 188-196, 2005.

MOREIRA, M. **Variabilidade genética de *Streptococcus mutans* em isolados intrafamiliares, por meio de marcadores RAPD**. Curitiba – PR: UFPR, 2006. 107p.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná, 2006.

MOURA, J. K. D.; BARROS, L. A.; OLIVEIRA, A. E. F.; RIBEIRO, C. C. C.; LOPES, F. F. Avaliação quantitativa do fluxo salivar estimulado em crianças e adolescentes. **Revista Odonto Ciência**, v. 23, n. 4, p. 380-383, 2008.

PHAM, L. C.; VAN SPANNING, R. J. M. V.; RÖLING, W. F. M.; PROSPERI, A. C.; TEREFWORK, Z.; TEN CATE, J. M. T.; CRIELAARD, W.; ZAURA, E. Effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* W24 on the compositional stability of oral microbial communities. **Archives of Oral Biology**, v. 54, p. 132-137, 2009.

POTINENI, R. V.; PETERSON, D. G. Influence of flavor solvent on flavor release and perception in sugar-free chewing gum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 14; 56, n. 9, p. 3254-3259, 2008.

POTINENI, R. V.; PETERSON, D. G. Mechanisms of flavor release in chewing gum: cinnamaldehyde. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 14; 56, n. 9, p. 3260-3267, 2008.

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

ROSSI, E. A.; CAVALLINI, D. C. U.; MANZONI, M. S. J.; ROSSI, P. R. (2011) “Produtos Probióticos e Prebióticos à Base de Soja.” In: SAAD, S. M. I.; da CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. 2011. São Paulo, SP: Livraria Varela, pp. 541-563, 669 p. 1ª edição.

SAAD, S. M. I.; BEDANI, R.; MAMIZUKA, E. M. (2011) “Benefícios à Saúde dos Probióticos e Prebióticos.” In: SAAD, S. M. I.; da CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. 2011. São Paulo, SP: Livraria Varela, pp. 51-84, 669 p. 1ª edição.

SABIKHI, L.; BABU, R.; THOMPSON, D. K.; KAPILA, S. Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. **Food Bioprocess Technology**, DOI 10.1007/s11947-008-0135-1, 2008.

SCANNAPIECO, F. A.; DASANAYAKE, A. P.; CHUN, N. “Does periodontal therapy reduce the risk for systemic diseases?” **Dental Clinics of North America**, v. 54, n. 1, p. 163-168, 2010.

SIVIERI, K.; SPINARDI-BARBISAN, A. L. T.; BARBISAN, L. F.; BEDANI, R.; PAULY, N. D.; CARLOS, I. Z.; BENZATTI, F.; VENDRAMINI, R. C.; ROSSI, E. A. Probiotic

Enterococcus faecium CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male Wistar rats. **European Food Research and Technology**, v. 228, p. 231-237, 2008.

STAMATOVA, I.; MEURMAN, J. H. Probiotics: Health benefits in the mouth. **American Journal of Dentistry**, v. 22, n. 6, p. 329-338, 2009.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**. 3rd ed. Academic Press, Orlando, 2004.

SHUE, T. Y.; MARSHALL, R. T.; HEYMANN, H. Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 7, p. 1902-1907, 1993.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; **Microbiologia**. 4. ed. 718 p. São Paulo: Atheneu, 2004.

TWETMAN, S.; STECKSEN-BLICKS, C. Probiotics and oral health effects in children. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 18, p. 3-10, 2008.