



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

DESENVOLVIMENTO DE PASTILHA POTENCIALMENTE PROBIÓTICA

Aluna: Juliana Jabur Polete Witzler

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini

ARARAQUARA - SP

2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de Araraquara

DESENVOLVIMENTO DE PASTILHA POTENCIALMENTE PROBIÓTICA

Aluna: Juliana Jabur Polete Witzler

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini

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

ARARAQUARA - SP

2016

Ficha Catalográfica

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

W834d

Witzler, Juliana Jabur Polete

Desenvolvimento de pastilha potencialmente probiótica / Juliana Jabur Polete Witzler. – Araraquara, 2016
88 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

Orientador: Daniela Cardoso Umbelino Cavallini

1. *Enterococcus faecium*. 2. Análise sensorial. 3. Probiótico. 4. Pastilha. I. Cavallini, Daniela Cardoso Umbelino, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

ORIENTADORA

Prof^ª. Dr^ª. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini

Prof^ª. Dr^ª. Raquel Bedani

Prof^ª. Dr^ª. Valéria de Carvalho Santo Ebinuma

ARARAQUARA - SP

2016

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de realizar o mestrado em uma instituição reconhecida pela qualidade do ensino como a UNESP. E também por ter me capacitado durante todo esse tempo e, me ajudado a concluir mais uma etapa.

Ao meu amado marido Lucas por toda a compreensão, apoio e encorajamento durante todo o tempo que precisei ficar fora de casa.

A minha mãe Lúcia, por me apoiar na decisão de fazer o mestrado e me dar todo o suporte necessário.

A Prof^a Daniela Cardoso Umbelino Cavallini por sua confiança, compreensão e por suas orientações e ensinamentos durante todo o período.

As técnicas do Laboratório de Pesquisa em Probióticos, Roseli e Josiane pelos ensinamentos e contribuições.

A Ana Luiza, Larissa, Flávia principalmente pela amizade, auxílio e apoio durante esse trabalho.

Aos docentes do Departamento de Alimentos e Nutrição da FCFAR-UNESP, pelo aprendizado e experiência concedidos durante o curso de mestrado.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição da FCFAR-UNESP, pela oportunidade de realização deste trabalho.

A Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pela Concessão de bolsa.

A Prof^a Ana Dóris pela cooperação ao permitir o uso do moinho de esferas no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica – FCFAR

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS	9
GENERAL ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO.....	14
OBJETIVOS	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
<i>CAPÍTULO I</i>	19
RESUMO	20
ABSTRACT	21
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1 Probióticos	24
2.2 Saúde bucal	26
2.3 Uso de microrganismos probióticos na manutenção da saúde oral.....	28
2.4 Pastilha.....	30
2.5 Microencapsulação	33
2.5.1 Técnica de extrusão	35
2.5.2 Técnica de coacervação complexa	36
3 CONCLUSÃO.....	37
4 BIBLIOGRAFIA.....	38
<i>CAPÍTULO II</i>	48
RESUMO	49

ABSTRACT	51
1 INTRODUÇÃO	53
2 MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1 Material	55
2.2 Métodos.....	55
2.2.1 Preparação da cultura probiótica	55
2.2.2 Elaboração da pastilha <i>diet</i>	57
2.2.3 Caracterização da pastilha <i>diet</i>	59
2.2.4 Avaliação do Potencial Anticariogênico da Cepa Probiótica	61
2.2.5 Análise Estatística dos Resultados.....	62
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1 Determinação da viabilidade celular	62
3.2 Elaboração da pastilha <i>diet</i>	66
3.3 Caracterização da pastilha <i>diet</i>	67
3.3.1 Análises microbiológicas.....	67
3.3.2 Análises físico-químicas	72
3.3.3 Análise Sensorial.....	73
3.4 Avaliação do Potencial anticariogênico da cepa probiótica	76
4 CONCLUSÕES	78
5 BIBLIOGRAFIA.....	80

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela 1: Composição dos três tipos de pastilhas produzidos.	58
Tabela 2: Viabilidade da cepa <i>E. faecium</i> CRL 183 (média $\pm$ DP - log UFC/g) nas formas livres e microencapsulada pelos métodos de extrusão (M1) e coacervação complexa (M2), seguidos de liofilização, ao longo do tempo de estocagem em temperatura ambiente.....	63
Tabela 3: Viabilidade da cepa de <i>E. faecium</i> CRL 183 (média $\pm$ DP - log UFC/g) adicionado às pastilhas potencialmente probióticas (PPP1 e PPP2) durante o período de estocagem.....	67
Tabela 4: Viabilidade da cepa de <i>E. faecium</i> CRL 183 (média $\pm$ DP - log UFC/g) adicionado às pastilhas potencialmente probióticas (PPP1 e PPP2), produzidas sem aroma, durante 28 dias de estocagem.	68
Tabela 5: Resultados (médias $\pm$ DP – log UFC/g) das análises microbiológicas das diferentes formulações de pastilhas.	71
Tabela 6: Resultados (médias $\pm$ DP) obtidos através das análises de atividade de água, umidade, pH e cor para as 3 formulações estudadas, ao longo dos 28 dias de estocagem.	73
Tabela 7: Resultados (médias $\pm$ DP) de aceitação das formulações PC, PPP1 e PPP2.....	74
Tabela 8: Viabilidade (médias $\pm$ DP) da cepa probiótica nas pastilhas e em células livres. ..	76

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1: Etapas básicas do processo de pastilhas..... 32

Capítulo II

Figura 2: Pastilhas diet controle (PC), e potencialmente probióticas (PPP1 e PPP2). 66

Figura 3: Médias dos resultados de intenção de compra das formulações. 75

RESUMO GERAL

A utilização de microrganismos probióticos para a manutenção da saúde bucal tem despertado o interesse da comunidade científica, tendo em vista que estudos indicam que tais microrganismos podem conferir benefícios como: atividade anticariogênica, tratamento de doenças periodontais e halitose, e redução na população de microrganismos patogênicos relacionados a patologias bucais. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento e a caracterização de uma pastilha alimentícia *diet* contendo o microrganismo *Enterococcus faecium* CRL 183 e a avaliação do potencial da referida cepa probiótica em sobreviver em saliva humana e inibir a multiplicação da cepa patogênica *Streptococcus mutans* ATCC 25175. O microrganismo *E. faecium* CRL 183 foi microencapsulado por extrusão e coacervação em matriz complexa. A técnica de coacervação complexa apresentou o melhor desempenho em relação à manutenção da viabilidade durante o período de armazenamento à temperatura ambiente (23°C), sendo selecionada para a produção das pastilhas potencialmente probióticas. As pastilhas foram processadas em três tratamentos: PC – pastilha controle, sem adição do probiótico; PPP1 – com adição do microrganismo probiótico e PPP2 – pastilha com adição do microrganismo probiótico e de inulina (prebiótico). Análises microbiológicas (viabilidade e segurança), físico-químicas (umidade, atividade de água, pH e cor) e sensoriais (testes de aceitação e intenção de compra) foram conduzidas no tempo inicial e ao longo do tempo de estocagem. A sobrevivência do probiótico à saliva e a inibição da multiplicação da cepa patogênica, foram avaliadas através da inoculação da cepa pura e das pastilhas em saliva e da técnica de difusão em poços, respectivamente. A cepa de *E. faecium* teve sua viabilidade reduzida ($p < 0,05$) imediatamente após a produção das pastilhas e durante o tempo de armazenamento à temperatura ambiente, em ambos os tratamentos PPP1 e PPP2. Na etapa de análise sensorial, as pastilhas apresentaram médias de aceitação superiores a seis para os atributos aroma, textura e impressão global, sem diferirem significativamente entre si ($p < 0,05$). A adição da cepa probiótica e da substância prebiótica reduziu a aceitação do produto em relação à aparência e cor e melhorou a impressão dos consumidores em relação ao sabor. As análises físico-químicas revelaram que as formulações PC, PPP1 e PPP2 não diferiram entre si em relação aos parâmetros físico-químicos avaliados, com exceção do parâmetro cor. Todos os tratamentos apresentaram características microbiológicas adequadas durante os 28 dias de

estudo. A cepa *E. faecium* CRL 183 inoculada em saliva humana na forma de pastilhas e de células livres teve sua população de células viáveis aumentada após 24 horas de incubação. O teste de difusão em poços evidenciou que a cepa probiótica foi capaz de inibir a multiplicação de *S. mutans* ATCC 25175 nas condições do estudo. Os resultados obtidos indicam que a associação do probiótico com inulina melhorou a aceitação do produto em relação ao atributo sabor e que a cepa probiótica sobrevive à saliva humana e apresenta potencial para inibir a multiplicação do microrganismo causador de cárie dental – *S. mutans* ATCC 25175. No entanto, a queda brusca da viabilidade da cepa probiótica durante o armazenamento das pastilhas, indica a necessidade de aprimoramento do processo de obtenção das mesmas, além de adequação da embalagem utilizada à matriz alimentícia.

Palavras chave: *Enterococcus faecium*, análise sensorial, probiótico, pastilha.

GENERAL ABSTRACT

The interest in the local effect of probiotic microorganisms is increasing among the scientific community, since studies have indicated that such microorganisms can present anticariogenic activity, help on the treatment of periodontal and halitosis diseases, and reduction in the population of pathogenic microorganisms associated to oral pathologies. The main purpose of this study was the development and characterization of a diet lozenge containing the probiotic strain *Enterococcus faecium* CRL 183. Its potential of surviving in the human saliva environment and the inhibition of the pathogenetic strain *Streptococcus mutans* ATCC 25175, were also evaluated. The probiotic strain *E. faecium* CRL 183 was microencapsulated through the extrusion and complex coacervation techniques. The last one was selected to the next step of the study (lozenges production), as it showed the best performance in comparison to the extrusion technique, regarding viability maintenance during the storage period at room temperature (23°C). The lozenges were produced through three different treatments: PC – control formulation, without the probiotic; PPP1 – probiotic formulation; PPP2 – probiotic formulation with inulin addition. Microbiologic (viability and security), physicochemical (moisture, water activity, pH and color) and sensorial (acceptance and purchase intention) analyses were conducted during the storage period. The probiotic survival to human saliva was evaluated through inoculation of the pure probiotic strain and the probiotic lozenges in saliva. The agar diffusion technique was used to evaluate the *E. faecium* CRL 183 inhibition potential against the pathogenic strain, *S. mutans* ATCC 25175. The probiotic strain had the viability decreased after the lozenges production and also during the storage period at room temperature for the PPP1 and PPP2 treatments. At sensorial analysis, lozenges showed acceptance averages higher than 6 to flavor, texture and global impression attributes, with no significant difference among them ($p < 0,05$). The addition of the probiotic strain and the prebiotic ingredient reduced the product acceptance regarding appearance and color and improved the flavor impression. The physicochemical analysis revealed that the formulations PC, PPP1 and PPP2 did not differ among themselves concerning the parameters evaluated, except for color. The microbiologic results obtained during the storage were appropriated to the confectionery category. The *E. faecium* strain inoculated in saliva as lozenges and as free cells had the cell viability increased after 24 h of incubation. The diffusion test showed that the probiotic strain was able to inhibit the growth of *S. mutans* ATCC 25175 in the study

conditions. The results suggested that the association of probiotic microorganism and inulin improved the acceptance of the product, in relation to the flavor attribute, and that the probiotic strain survived in the human saliva and has potential to inhibit the multiplication of dental caries-causing organism – *S. mutans* ATCC 25175. However, the drastic viability reduction during the storage period indicates the necessity of a process refinement and also the adjustment of the packaging to food matrix.

Keywords: *Enterococcus faecium*, sensorial analysis, probiotic, lozenges.

INTRODUÇÃO

Probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; HILL *et al.*, 2014).

Há inúmeros efeitos benéficos proporcionados pelos probióticos que podem ser citados, entre eles: alívio dos sintomas causados pela intolerância à lactose, tratamento de diarreias, redução do colesterol sérico, modulação da resposta imune e prevenção de doenças infecciosas (CAVALLINI *et al.*, 2013; CELIBERTO *et al.*, 2013; KALE-PRADHAM *et al.*, 2010; SAAVENDRA, 2001). Merecem destaque os efeitos relacionados à saúde bucal, tema que tem estimulado novas pesquisas nos últimos anos. Estudos indicam importantes benefícios dos probióticos para a cavidade oral, como potencial anticariogênico, tratamento de doenças periodontais e halitose e redução da população de microrganismos envolvidos em patologias bucais (HAUKIOJA, 2010).

O microrganismo probiótico pode ser administrado como suplemento, em formas farmacêuticas, ou ser incorporado a diferentes alimentos fermentados ou não. Para ser considerado probiótico, o alimento deve apresentar uma população de células viáveis entre 10^8 a 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante (ANVISA, 2008). Além disso, é indispensável que a cepa probiótica não só apresente segurança para o consumo humano (FAO/WHO, 2002), mas que também resista às condições adversas, tais como variações de pH e temperatura e exposição ao oxigênio, tanto durante o processamento tecnológico e período de estocagem, como durante o trânsito gastrointestinal (FOLIGNÉ *et al.*, 2013). É dentro desse contexto que reside o desafio para a maioria dos pesquisadores, tendo em vista que os microrganismos probióticos podem apresentar sensibilidade a tais condições adversas citadas, sendo essa característica cepa dependente.

A microencapsulação – técnica que permite recobrir diferentes partículas, formando microcápsulas - constitui uma alternativa para melhorar a resistência e preservar a viabilidade dos microrganismos probióticos durante as diferentes etapas de processamento, estocagem e passagem pelo trato gastrointestinal (FÁVARO-TRINDADE, 2011).

Também é importante ressaltar que a maior parte dos alimentos contendo microrganismos probióticos é de derivados lácteos fermentados, já que estudos indicam que essa é a matriz mais adequada à veiculação de tais microrganismos (ERKKILÄ *et al.*, 2001; POSSEMIERS *et al.*, 2010). Documentos históricos relatam que, desde muitos séculos atrás, os probióticos já faziam parte da dieta de diversos povos, na forma de alimentos ou bebidas tradicionais fermentadas (KUMAR *et al.*; 2015). No entanto, nos dias atuais, existe uma tendência mundial à diversificação desse segmento, através da incorporação de microrganismos probióticos em diferentes tipos de matrizes não lácteas e não fermentadas (POSSEMIERS *et al.*, 2010; RIVIERA-ESPINOZA; GALARDO-NAVARRO, 2010).

As pastilhas são confeitos versáteis e simples de serem produzidos, com grande aceitação frente ao mercado consumidor, podendo ser comercializados por indústrias farmacêuticas e alimentícias (EDWARDS, 2001). Ao se desintegrarem lentamente na boca, conferem uma sensação de frescor e podem veicular diversos compostos, como vitaminas, minerais, fibras, ácidos graxos essenciais, fitoquímicos e, microrganismos probióticos (EDWARDS, 2001).

Dentro desse contexto, mostra-se oportuno o desenvolvimento de uma pastilha *diet* potencialmente probiótica, com adição de *Enterococcus faecium* CRL 183 microencapsulado e liofilizado.

OBJETIVOS

Objetivos Gerais

O presente estudo teve por objetivo o desenvolvimento e a caracterização de uma pastilha alimentícia *diet* potencialmente probiótica, com adição de *E. faecium* CRL 183 microencapsulado e liofilizado.

Objetivos Específicos

O projeto foi planejado para ser realizado em três etapas distintas:

Primeira Etapa:

- Avaliar a eficiência dos processos de microencapsulação da cepa probiótica (*E. faecium* CRL 183), pelos métodos de extrusão e coacervação em matriz complexa, seguido de liofilização.

Segunda Etapa:

- Elaborar e caracterizar a pastilha com base em parâmetros físico-químicos, microbiológicos e sensoriais de pastilhas *diet* com adição da cepa probiótica microencapsulada e liofilizada que apresentar o melhor desempenho na etapa anterior.

Terceira Etapa:

- Avaliar a capacidade de sobrevivência da cepa probiótica *E. faecium* CRL 183 na saliva humana.
- Avaliar o potencial anticariogênico de *E. faecium* CRL 183, através da técnica de difusão em poços, utilizando como microrganismo indicador a cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos.** Jul. 2008. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov>>. Acesso em: 28 mar. 2015.

CAVALLINI, D. C. U; CELIBERTO, L.S.; ROSELINO, M.N.; BEDANI, R.; PAULY-SILVEIRA, N.D.; VALDEZ, G.F.; PINTO, R.A.; ROSSI, E.A. **Effect of a probiotic fermented soy product on colonic inflammation in dextran sodium sulfate-induced colitis in rats.** 7 th Probiotics & Prebiotics new foods, Rome, 2013.

CELIBERTO, L.S.; ROSELINO, M.N.; BEDANI, R.; ROSSI, E.A.; PINTO, R.A.; PAULY-SILVEIRA, N.D.; VALDEZ, G.F; CAVALLINI, D.C.U. **Effect of a probiotic soy beverage and sulfasalazine on fecal microbiota of animals with colitis induced by dextran-sodium sulfate.** 7 th Probiotics & Prebiotics new foods, Rome.

EDWARDS, W.P. Introduction. In: EDWARDS, W.P **The science of sugar confectionery.** Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2001, p.2-3.

ERKKILÄ, S.; PETÄJÄ, E.; EEROLA, S.; LILLEBERG, L.; MATTILA-SANDHOLM, T.; SUINKO, M.L.;. Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter culture. **Meat Science**, v.58, p.111-116, 2001.

FAO/WHO. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.** Córdoba, 2001, 34p. Disponível em <http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf>. Acesso em 27 mar. 2015. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation].

FAO/WHO. Joint of FAO/WHO Working Group. **Report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food.** London, Ontario, Canada, 30 de abril e 1º maio, 2002

FÁVARO-TRINDADE, C.S. Microencapsulação de probióticos. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F (Org.). **Probióticos e Prebióticos em Alimentos.** São Paulo: Ed. Varela, 2011, p. 239-254

FOLIGNÉ, B.; DANIEL, C.; POT, B. Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. **Current Opinion in Microbiology**, v.16, p.284-292, 2013.

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

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.11, p.506–514, 2014.

KALE-PRADHAN, P.B.; JASSAL, H. K.; WILHELM, S. M. Role of Lactobacillus in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a meta analysis. **Pharmacotherapy**, v.30, p.119-126, 2010.

KUMAR, H.; SALMINEN, S.; VERHAGEN, H.; ROWLAND, I.; BAÑARES, S.; YOUNG, T.; NOMOTO, K.; LALONDE, M. Novel probiotics and prebiotics: road to the market. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 32, p.99-103, 2015.

POSSEMIERS, S.; MARZORATI, M.; VERSTRAETE, W.; VAN DE WIELE, T. Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p. 97–103, 2010.

RIVIERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-diary probiotic products. **Food Microbiology**, v.27, p.1-11, 2010.

SAAVEDRA, J.M. Clinical application of probiotic agents. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p.1147S-1151S, 2001.

CAPÍTULO I

Probióticos e Saúde Bucal: aspectos tecnológicos e funcionais

RESUMO

Alimentos probióticos são classificados como produtos funcionais, categoria essa que tem ganhado mais importância na vida das pessoas, conforme cresce o interesse por um estilo de vida saudável. Microrganismos probióticos são comumente adicionados a alimentos com o propósito de promover a saúde através dos diversos benefícios já comprovados cientificamente, entre eles, alívio dos sintomas causados pela intolerância à lactose, controle de diarreias, modulação da resposta imune e do perfil lipídico e redução de doenças infecciosas e inflamatórias. A utilização de microrganismos probióticos para a manutenção da saúde bucal tem despertado o interesse da comunidade científica, tendo em vista que estudos indicam que tais microrganismos podem conferir benefícios como: atividade anticariogênica, tratamento de doenças periodontais e halitose, e redução na população de microrganismos patogênicos relacionados às patologias bucais. Para tanto se faz necessário a utilização de alimentos veículos que permaneçam um maior período de tempo na cavidade oral como pastilhas, balas e gomas de mascar. O presente trabalho se propõe a reunir informações, baseadas em evidências científicas, relacionadas ao uso de microrganismos probióticos e manutenção da saúde bucal e os desafios tecnológicos que devem ser superados para o desenvolvimento de produtos que cumpram essa função.

Palavras chave: probiótico, microbiota oral, saúde oral, pastilhas.

ABSTRACT

Probiotic foods are classified as functional products, a category which has gained more importance in people's lives as growing interest in a healthy lifestyle. Probiotic microorganisms are commonly added to food products in order to promote health. There are many benefits scientifically confirmed, such as relief of lactose intolerance symptoms, diarrhea control, modulation of the immune responses and lipid profile, decrease of infectious and inflammatory diseases. The interest in the local effect of probiotic microorganisms is increasing among the scientific community, since studies have indicated that such microorganisms can present anticariogenic activity, help on the treatment of periodontal and halitosis diseases, and reduction in the population of pathogenic microorganisms associated to oral pathologies. In this context, it is necessary the use food matrix which remain a longer time in the oral cavity, as caramels, chewing guns, lozenges and gummies. This study aims to collect information, based on scientific evidence, related to the use of probiotic microorganisms and maintaining oral health and the technological challenges that must be overcome to develop products that comply with this function

Keywords: probiotics, oral microbiota, oral health, lozenges.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a demanda por alimentos funcionais conhecidos por promoverem a saúde através de mecanismos não previstos na nutrição convencional (ROBERFROID, 2007), tem aumentado à medida que cresce a conscientização da população a respeito dessa categoria de produtos e dos seus benefícios. Alimentos probióticos estão incluídos na categoria de alimentos funcionais, e a demanda por produtos probióticos segue a mesma tendência de mercado.

Há inúmeros efeitos benéficos proporcionados pelos probióticos que podem ser citados, entre eles: alívio dos sintomas causados pela intolerância à lactose, tratamento de diarreias, redução do colesterol sérico, modulação da resposta imune e prevenção de doenças infecciosas (CAVALLINI *et al.*, 2013; CELIBERTO *et al.*, 2013; KALE-PRADHAM *et al.*, 2010; SAAVENDRA, 2001). Os efeitos locais dos probióticos relacionados à saúde bucal é um tema que tem estimulado novas pesquisas nos últimos anos. Estudos indicam importantes benefícios para a cavidade oral, como potencial anticariogênico, tratamento de doenças periodontais e halitose e redução da população de microrganismos envolvidos em patologias bucais (HAUKIOJA, 2010). Um dos principais mecanismos de ação dos probióticos na cavidade oral consiste na formação de biofilmes, onde espaços que poderiam abrigar bactérias patogênicas são preenchidos, evitando assim a atuação das mesmas. Além disso, probióticos também exercem efeito protetor ao competirem com bactérias cariogênicas e causadoras de doenças periodontais (ÇAGLAR; KARGUL; TANBOGA, 2005; COMELLI *et al.*, 2002). Estudos também comprovam benefícios com relação à redução de gengivite e halitose (GRUDIANOV *et al.*, 2002; KANG *et al.*, 2006).

O microrganismo probiótico pode ser administrado como suplemento, em formas farmacêuticas, ou ser incorporado a diferentes alimentos fermentados ou não. Para ser considerado probiótico o alimento deve apresentar uma população de células viáveis entre 10^8 a 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante (ANVISA, 2008). Além disso, é indispensável que a cepa probiótica apresente segurança para o consumo humano (FAO/WHO, 2002).

Desenvolver alimentos que apresentem a dose adequada de microrganismos probióticos no momento do consumo é desafiador, já que diversos fatores como variações de

pH, temperatura e exposição ao oxigênio podem contribuir para a queda de viabilidade (FOLIGNÉ *et al.*, 2013). Não se pode esquecer que a cepa em questão ainda precisará resistir às condições adversas encontradas durante o trânsito gastrointestinal (FOLIGNÉ *et al.*, 2013). A sensibilidade a tais condições adversas citadas é uma característica cepa dependente (SHA, 2007).

A microencapsulação – técnica que permite recobrir diferentes partículas, formando microcápsulas - constitui uma alternativa para melhorar a resistência e preservar a viabilidade dos microrganismos probióticos durante as diferentes etapas de processamento, estocagem e passagem pelo trato gastrointestinal (FÁVARO-TRINDADE, 2011).

Também é importante ressaltar que a maior parte dos alimentos contendo microrganismos probióticos é de derivados lácteos fermentados, já que estudos indicam que essa é a matriz mais adequada à veiculação de tais microrganismos (ERKKILÄ *et al.*, 2001; POSSEMIERS *et al.*, 2010). No entanto, existe uma tendência mundial de diversificação desse segmento, através da incorporação de microrganismos probióticos em diferentes tipos de matrizes não lácteas e não fermentadas (POSSEMIERS *et al.*, 2010; RIVIERA-ESPINOZA; GALARDO-NAVARRO, 2010).

As pastilhas são confeitos versáteis e simples de serem produzidos, com grande aceitação frente ao mercado consumidor, podendo ser comercializadas por indústrias farmacêuticas e alimentícias (EDWARDS, 2001). Ao se desintegrarem lentamente na boca, conferem uma sensação de frescor e podem veicular diversos compostos, como vitaminas, minerais, fibras, ácidos graxos essenciais, fitoquímicos e microrganismos probióticos (EDWARDS, 2001).

Considerando o exposto, o objetivo desse capítulo foi revisar o uso de probióticos para a manutenção da saúde bucal, os mecanismos associados a esse potencial efeito benéfico e os desafios tecnológicos que devem ser superados para a incorporação de tais microrganismos em alimentos que permaneçam mais tempo na cavidade oral.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Probióticos

A indústria de alimentos enfrenta o desafio de atender a demanda da sociedade atual por um estilo de vida saudável. Para ir de encontro a tal necessidade, a indústria tem investido em novas tecnologias para o desenvolvimento de produtos funcionais (BIGLIARDI; GALATI, 2013).

Os alimentos funcionais podem ser definidos como aqueles que possuem algum potencial para promover a saúde através de mecanismos não previstos na nutrição convencional, enfatizando-se que tal efeito limita-se à promoção da saúde e não à cura de doenças (ROBERFROID, 2007). Uma abordagem atual sugere que os alimentos funcionais estabelecerão no futuro, uma nova relação entre alimentos e saúde no dia-a-dia das pessoas (BALLAI; LANCIAI, 2012).

É possível classificar os alimentos funcionais de acordo com a própria natureza do alimento, ou então de acordo com os compostos bioativos presentes na composição do produto, como por exemplo, os microrganismos probióticos, as fibras, os fitoquímicos, as vitaminas, os minerais, os ácidos graxos ômega 3, determinados peptídeos e proteínas, entre outros (ARVANITOYANNI; HOUWELINGENKOUKALIAROGLOU, 2005).

O mercado de alimentos funcionais tem crescido consideravelmente, saltando de U\$33 bilhões no ano 2000 para U\$176,7 bilhões em 2013, fatia essa que representa 5% do mercado global de alimentos (TRIPATHI; GIRI, 2014). Esse crescimento está associado à percepção do consumidor em relação aos benefícios que podem ser proporcionados pelo consumo de tais produtos.

Os probióticos já foram classicamente definidos como “suplementos alimentares à base de microrganismos vivos, que afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o balanço de sua microbiota intestinal” (FULLER, 1989). Em 2001, a FAO/WHO e seu grupo de especialistas definiram probióticos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). Embora exista um esforço e alinhamento internacional para evitar que essa definição abra

margens para outras interpretações que possam levar o consumidor ao erro, essa ainda é a definição mais aceita pela comunidade científica (HILL *et al.*, 2014).

O consumo de microrganismos probióticos tem sido associado ao aumento de resistência às doenças infecciosas (PERDIGON *et al.*, 1995), a redução de sintomas ocasionados por diarreia, intolerância à lactose e gastroenterites (FÁVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011), proteção contra infecções respiratórias, vaginais e urogenitais (HATAKKA *et al.*, 2001; HILTON *et al.*, 1992), redução de riscos de câncer de cólon (SIVIERI *et al.*, 2008) e melhora no perfil lipídico (CAVALLINI *et al.*, 2009).

Deve-se ressaltar que a maioria dos efeitos benéficos atribuídos aos probióticos envolve a modulação da microbiota intestinal. A ação benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui produção de fatores antagônicos, competição por sítios de ligação e efeitos imunológicos, resultando em aumento da resistência contra os patógenos. Assim, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesas do hospedeiro (PUUPPONEN-PIMIA *et al.*, 2002). Os probióticos têm sido utilizados visando principalmente à saúde gastrointestinal, mas nos últimos anos, muitos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de comprovar a extensão de seus efeitos em outras microbiotas como a bucal, vaginal e da pele (FOLIGNÉ *et al.*, 2013).

Os microrganismos mais comumente encontrados em produtos probióticos são pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. Cepas dos gêneros *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia* spp., *Propionibacterium* spp. e leveduras do gênero *Saccharomyces* spp. também têm apresentado resultados promissores para uso como probióticos (CEAPA *et al.*, 2013). Entretanto, deve ser salientado que o efeito de uma bactéria é cepa dependente, não podendo ser extrapolado, inclusive para outras cepas da mesma espécie (SHA, 2007).

A cepa *Enterococcus faecium* CRL 183, isolada de queijo Tafí (queijo caseiro tradicional de terras altas, na província de Tucumán, Argentina) resiste ao trânsito gastrointestinal e é considerada segura para o consumo humano (SAAVEDRA *et al.*, 2003). Entre as propriedades funcionais atribuídas a essa cepa estão: modulação do perfil lipídico, da microbiota intestinal e do sistema imune, e redução do risco de desenvolver doenças

inflamatórias intestinais e câncer de cólon e de mama (CAVALLINI *et al.*, 2009a; 2009b; 2011; CELIBERTO, 2014; KINOUCI, 2006; ROSSI *et al.*, 2000; 2003; 2008; SIVIERI *et al.*, 2008).

Para que um alimento seja considerado probiótico, a legislação brasileira exige que o produto apresente o mínimo de 10^8 a 10^9 UFC na porção diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante (ANVISA, 2008). A cepa probiótica selecionada deve, além de ser segura para o consumo humano, ser capaz de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal, ou seja, resistir ao ambiente ácido encontrado no estômago e aos altos níveis de sais biliares encontrados no intestino (DUNCAN; FLINT, 2013).

2.2 Saúde bucal

Em indivíduos saudáveis, a cavidade oral é formada por uma microbiota muito bem balanceada abrigando mais de 700 espécies (TERAI *et al.*, 2015). Um desequilíbrio na microbiota oral pode ocasionar aumento na população de bactérias patogênicas em detrimento de cepas benéficas nativas, e como resultado, pode-se observar a ocorrência de cáries ou periodontites (SAMOT; BADET; 2013).

Um dos propósitos de se manter a saúde da cavidade oral ao longo da vida é a preservação da arcada dentária. Para isso, é importante tomar medidas para evitar ou tratar doenças orais, como cáries dentais, gengivites, periodontites, e infecções causadas por bactérias, vírus ou fungos. Em países desenvolvidos, o crescente número de idosos com dentes preservados é inversamente proporcional ao número de adultos com cáries, graças a uma rotina diária de cuidados com a saúde bucal (MORIYA; ANDO; MIURA, 2011).

A cárie dental é definida como uma doença infecciosa e transmissível aos tecidos calcificados dos dentes que resulta em perda local dos tecidos duros (JORGE, 2007). Trata-se de uma doença multifatorial por ser dependente de três fatores principais: a) características do hospedeiro, representado pelos dentes e saliva; b) a microbiota e c) a dieta consumida (HAUKIOJA, 2009). Pode-se citar ainda o tempo como um quarto fator interferente no

processo de desenvolvimento da cárie. Ou seja, para a ocorrência da cárie, os três primeiros fatores precisam interagir entre si durante um período de tempo (JORGE, 2007).

O *Streptococcus* da espécie *mutans* se apresenta na forma de cocos gram-positivos em cadeias, catalase negativos, não formadores de esporos e anaeróbios facultativos. É considerado o principal microrganismo causador da cárie dental. Seu hábitat primário é a superfície dentária, onde a colonização é favorecida por dieta rica em sacarose (JORGE, 2007). Esse microrganismo é capaz de produzir polissacarídeos extracelulares solúveis e insolúveis a partir da sacarose e de sintetizar polissacarídeos intracelulares atuantes como reservas de carboidratos, que podem ser convertidos em ácido durante períodos em que carboidratos da dieta não estão disponíveis. A capacidade de produzir ácido, em uma taxa extremamente rápida a partir de carboidratos fermentáveis, contribui para o seu potencial cariogênico. Igualmente importante é a sua capacidade de se multiplicar e sobreviver sob condições ácidas, pela expressão de uma resposta específica de estresse molecular (MARSH; MARTIN, 2005).

A doença periodontal pode ser definida como uma série de situações patológicas complexas e distintas, causadas pela interação do biofilme dentário e o hospedeiro. Tal interação pode resultar em destruição do osso alveolar de suporte e do tecido conjuntivo. Dentre as 700 espécies que podem ser encontradas na cavidade oral, 10 a 20 delas apresentam potencial de produzir a doença (JORGE, 2007). Os tipos mais comuns de doença periodontal são a periodontite crônica em adultos e a gengivite marginal crônica. Em geral, nas doenças periodontais, o epitélio do tecido juncional na base do sulco gengival migra em direção à raiz do dente formando a bolsa periodontal. Isto ocorre como resultado direto e indireto da ação dos microrganismos, e dos efeitos colaterais da resposta inflamatória desenvolvida pelo hospedeiro em resposta ao acúmulo de placa bacteriana (MARSH; MARTIN, 2005).

A gengivite marginal crônica é uma resposta inflamatória não específica à placa dental envolvendo a gengiva marginal. Geralmente, a gengivite ocorre como resultado de uma proliferação não específica da microbiota normal do sulco gengival, decorrente de uma higiene bucal deficiente. Se uma rotina diária de higiene oral é restaurada, em geral a gengivite é erradicada, e os tecidos retornam à condição normal. Em quadros de gengivite observa-se um aumento de dez a vinte vezes na massa da placa e *Actinomyces* spp. se tornam predominantes. As proporções de bactérias captonofílicas (bactérias que crescem em ótimas

concentrações de gás carbônico) e anaeróbios estritos Gram negativos também aumentam (MARSH; MARTIN, 2005).

Já a periodontite crônica em adultos representa a forma mais comum da doença periodontal avançada, sendo a principal causadora de perda dentária após os 25 anos de idade. Ela difere da gengivite marginal crônica quanto à adição do envolvimento da gengiva, havendo uma perda de ligação entre superfície radicular, a gengiva e o osso alveolar, podendo ocorrer perda óssea. Cálculos subgengivais, restaurações em excesso, ou dentes apinhados podem predispor o desenvolvimento da doença (MARSH; MARTIN, 2005). A microbiota da periodontite é predominantemente Gram negativa, anaeróbia e com mobilidade (JORGE, 2007).

Estudos revelam que as doenças periodontais não somente causam perda da qualidade de vida, mas também aumentam os riscos de desordens sistêmicas tais como doenças coronarianas, cardiovasculares, cerebrais, diabetes, infecções respiratórias, além de pré-eclampsia em gestantes (GULATI *et al.*, 2013).

2.3 Uso de microrganismos probióticos na manutenção da saúde oral

Considerando os efeitos benéficos atribuídos ao consumo de probióticos, principalmente os relacionados à capacidade de inibir a multiplicação de microrganismos patogênicos, o estudo da ação de tais microrganismos se estendeu também sobre a cavidade oral e a promoção de sua saúde.

Bactérias probióticas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. e *Streptococcus* spp. têm apresentado eficácia na prevenção de cáries dentais, através da redução do número de bactérias cariogênicas presentes na saliva, após curto período de consumo de probióticos (BIZZINI *et al.*, 2012).

Tratamentos tradicionais para doenças na cavidade oral são bastante dispendiosos, e por isso doenças orais são consideradas a quarta categoria de doença mais cara para se tratar em ranking estabelecido em países desenvolvidos (YEE; SHEIHAM, 2002). A cárie dental e doenças periodontais têm sido vistas como resultado de um desequilíbrio em que a microbiota

oral passa a apresentar predominantemente espécies acidogênicas e ácido tolerantes Gram positivas, responsáveis por muitas doenças orais (BIZZINI *et al.*, 2012). Probióticos representam uma importante ferramenta para restabelecer o equilíbrio da microbiota oral.

O principal requisito para que um microrganismo seja um probiótico de ação oral é a habilidade de aderir e colonizar superfícies na cavidade oral. Os mecanismos de ação dos probióticos na cavidade oral são semelhantes aos de ação gastrintestinais já conhecidos. Podem-se citar como prováveis mecanismos de ação, a competição por sítios de adesão, formação de agregados, competição por nutrientes, produção de compostos antimicrobianos, aumento das respostas imunológicas do hospedeiro e inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias. Conseqüentemente, chega-se ao antagonismo contra os patógenos e redução da inflamação e da destruição dos tecidos (VISHNU, 2012).

Estudos em que o efeito de microrganismos probióticos sobre cáries dentais foi investigado mostraram a redução da população de *S. mutans* na saliva após o consumo de alimentos probióticos (VISHNU, 2012).

Näse *et al.*, (2001) comprovaram redução na incidência de cáries em crianças que consumiram leite enriquecido com *Lactobacillus rhamnosus* GG. Tal efeito foi associado à redução na população de *S. mutans*, principal agente causador de cáries, presente na saliva (LOESCHE, 1986). Çaglar *et al.*, (2006) verificaram redução nos níveis de *S. mutans* na saliva de jovens adultos após a ingestão *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 na forma de tabletes mastigáveis. Em 2008, Çaglar *et al.*, verificaram novamente a redução de *S. mutans*, porém dessa vez, através do consumo de sorvete contendo *Bifidobacterium lactis* Bb-12.

Lactobacillus spp. e *Bifidobacterium* spp. são os gêneros mais estudados como probióticos para cavidade oral. Porém, outros gêneros também têm sido estudados com sucesso. Suzuki *et al.*, (2011) verificaram que as cepas de *Enterococcus faecium* WB2000 e JCM5804 foram capazes de inibir a formação de biofilme por *Streptococcus* spp. Burton *et al.*, (2013) comprovaram os efeitos de uma cepa de *Streptococcus salivarius*, veiculada através de pastilhas, na redução da população de *S. mutans* em crianças que receberam tratamento probiótico por três meses.

Já com relação aos efeitos de probióticos sobre doenças periodontais, estudos também indicam a redução de microrganismos patogênicos relacionados a tais doenças. Riccia *et al.*,

(2007) estudaram os efeitos antiinflamatórios de *Lactobacillus brevis* em pacientes com periodontite crônica. O tratamento utilizou pastilhas como veículo para o microrganismo probiótico durante 4 dias, e após esse período melhorias em parâmetros clínicos como índice de placa, gengival e sangramento foram observados em todos os pacientes. Twetman *et al.*, (2009) observaram os efeitos de duas cepas de *L. reuteri* (ATCC 55730 e ATCC PTA 5289) em pacientes portadores de gengivite. Nesse estudo, o veículo utilizado foi a goma de mascar e os pacientes foram instruídos a mascar a goma por dez minutos ao longo de duas semanas. O consumo diário dos probióticos, associados às instruções de higiene oral, resultou em redução significativa de sangramento nas gengivas e redução de citocinas pró-inflamatórias.

Probióticos também podem auxiliar no combate à halitose. Uma microbiota desequilibrada pode produzir compostos sulfurosos voláteis que causam odores desagradáveis na cavidade oral. Esses compostos são subprodutos da degradação microbiana de proteínas, sangue e mucinas encontradas na saliva, além de restos de alimentos retidos em superfícies da cavidade oral. Kazor *et al.*, (2003) concluíram que *S. salivarius* é a espécie predominante na língua de indivíduos que possuem a microbiota oral em estado de equilíbrio, e tem a função de produzir bacteriocinas que contribuem para a redução do número de bactérias produtoras de compostos sulfurosos voláteis (VISHNU, 2012).

Para que os efeitos benéficos dos probióticos sejam observados é interessante que tais microrganismos permaneçam um maior período de tempo em contato com a cavidade oral. Nesse sentido, produtos de confeitaria, como balas, gomas de mascar e pastilhas, constituem boas alternativas para a veiculação de probióticos.

2.4 Pastilha

Ao longo dos últimos 10 anos, os produtos probióticos, principalmente a categoria de lácteos fermentados, têm ganhado destaque no mercado. As indústrias têm feito uso dos apelos de benefícios à saúde conferidos pelos microrganismos probióticos, com o objetivo de valorizar seu produto e ganhar maiores fatias de mercado. Esse cenário tem impulsionado diversos estudos científicos que visam à comprovação da eficácia terapêutica dos probióticos

(SAAD *et al.*, 2013). Por outro lado, dados de pesquisas comprovam que a intolerância à lactose é uma desordem genética bastante comum, causada pela deficiência da enzima lactase no intestino, chegando a atingir mais de 46% da população mundial (PROZYN, 2010). Portanto, apesar da matriz láctea ser considerada a mais adequada para a manutenção da viabilidade dos microrganismos probióticos (ERKKILÄ *et al.*, 2001; POSSEMIERS *et al.*, 2010), nos últimos anos há uma tendência de diversificação desse mercado, sendo que várias matrizes não lácteas tem sido testadas como veículos de microrganismos probióticos (RIVIERA-ESPINOZA; GALARDO-NAVARRO, 2010).

As pastilhas são confeitos duros que se dissolvem lentamente na boca, sendo consideradas um dos tipos mais antigos de confeitos.

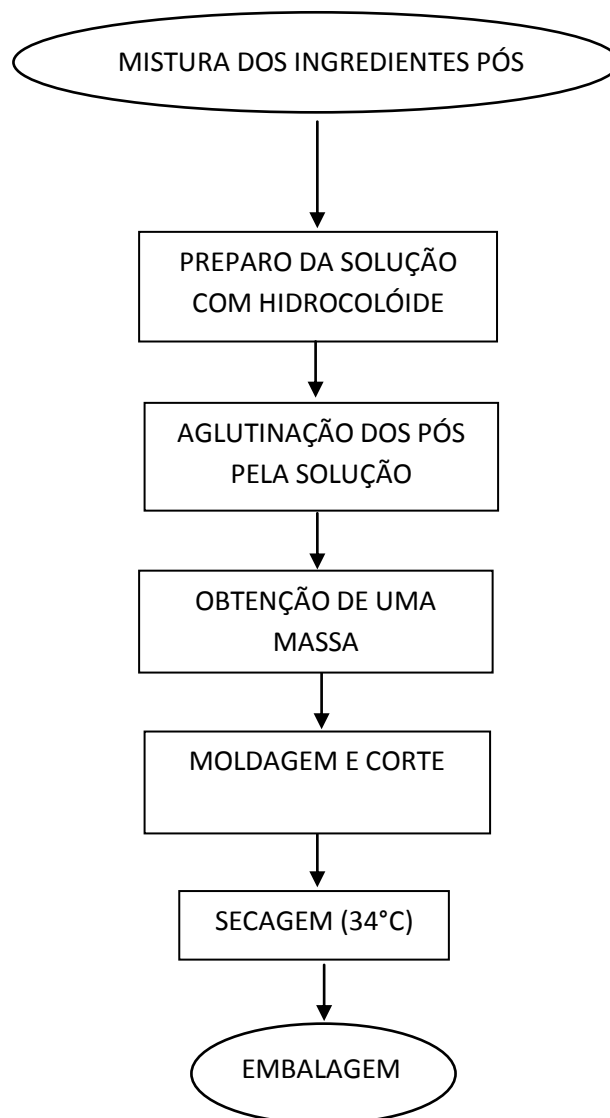
O processo para a obtenção desse produto não requer o preparo de uma calda fervente de açúcar, que é indispensável no processo de diversas outras categorias de confeitos, como *foudants*, balas de gelatina, balas moles, balas duras, caramelos, etc. Por esse motivo, o processo de obtenção de pastilhas é considerado simples, e pode inclusive ser reproduzido em escala artesanal.

Em geral, as pastilhas são preparadas através do processo de moldagem, onde um ou dois hidrocolóides possuem a função de aglutinar os ingredientes pós, e, a partir da massa obtida, as pastilhas são moldadas, cortadas e, em seguida, desidratadas. Nesse processo, as pastilhas podem ser chamadas de “lozenges”. Existe também o processo de compressão, onde todos os ingredientes são pós com a propriedade de coesão, e quando submetidos a uma compressão são compactados. Já nesse último processo, as pastilhas obtidas são chamadas de “tabletes”. A literatura internacional deixa bem clara a diferença entre os dois processos (EDWARDS, 2001).

Os hidrocolóides mais utilizados na obtenção de pastilhas são gelatina, goma acácia e xantana. Enquanto que açúcar impalpável, ou polióis como sorbitol ou xilitol, e aromas, são os ingredientes utilizados na forma de pós (EDWARDS, 2001).

A Figura 1 representa o processo de obtenção de pastilhas classificadas como lozenges:

Figura 1: Etapas básicas do processo de pastilhas.



A categoria de pastilhas não é só relacionada à área de alimentos, mas também à área farmacêutica. A literatura relata que as pastilhas foram criadas pelo farmacêutico inglês James Loft, em meados de 1865. James Loft era proprietário de uma farmácia em Fleetwood, região costeira de Lancashire (Inglaterra), onde muitos pescadores e navegadores voltavam de suas atividades apresentando problemas bronquiais. Para aliviar os sintomas, e considerando as dificuldades desses homens em carregar consigo líquidos em recipientes de vidro, que facilmente quebravam durante as viagens, James formulou algo sólido. A formulação era basicamente composta por mentol, óleo de eucalipto e cápsico, dispersos em açúcar. Uma massa era obtida, moldada e cortada em pedaços bem pequenos e, posteriormente,

desidratadas em forno. O produto criado por James Loft ficou tão famoso entre os pescadores e navegadores da cidade, que anos mais tarde originou a marca “*Fisherman’s Friend*” (RAMOND, 2002).

A literatura científica apresenta estudos em que confeitos na forma de pastilhas foram utilizados como veículos para administração de probióticos. Çaglar *et al.*, (2007) utilizaram pastilhas de xilitol para veicular três vezes ao dia durante três semanas, duas cepas de *L. reuteri* em adultos jovens. Após o tempo de tratamento, observou-se redução significativa na população de *S. mutans*. Hallstrom *et al.*, (2013) também utilizaram pastilhas como veículo de *L. reuteri* para avaliar o efeito de doses diárias (duas vezes por dia) sobre a resposta inflamatória e composição supragengival da placa bacteriana em mulheres jovens e saudáveis. No entanto, após uma semana de tratamento e duas semanas de “wash out” não foi observada melhora significativa nos parâmetros clínicos avaliados. Campus *et al.*, (2014) avaliaram o efeito de *L. brevis*, veiculado através de pastilhas de manitol, sobre a placa bacteriana e contagens de *S. mutans* em crianças. Após 6 semanas de tratamento, benefícios importantes foram alcançados: redução da placa, da população de *S. mutans* e de sangramentos gengivais.

É importante destacar que nenhum dos estudos avaliou os aspectos tecnológicos das pastilhas e a viabilidade dos microrganismos probióticos durante o período de armazenamento.

A sobrevivência dos microrganismos probióticos nos alimentos é afetada por diversos fatores como composição da matriz alimentícia, pH, fonte de carbono, exposição ao oxigênio e variação do binômio tempo-temperatura durante o processamento e estocagem (FOLIGNÉ *et al.*, 2013). Nesse sentido, o desafio para os pesquisadores consiste em selecionar a cepa mais adequada e desenvolver métodos e processos que garantam a estabilidade e a viabilidade da cepa durante todo o período de processamento e estocagem (DUNCAN; FLINT, 2013).

2.5 Microencapsulação

A incorporação de células probióticas a matrizes alimentícias é desafiada pela preservação de sua viabilidade durante as etapas de processamento, estocagem e passagem pelo trato gastrointestinal, onde o alimento muitas vezes é submetido a variações de

temperatura, pH, incorporação de oxigênio, contato com sais biliares, agentes antibacterianos, entre outras condições (LEE; HEO; 2000; LÓPEZ-RUBIO *et al.*, 2009; SULTANA *et al.*, 2000; SUNOHARA *et al.*, 1995). Além desses fatores, algumas cepas probióticas podem produzir *off-flavors* (sabores indesejados) ao se multiplicarem na matriz alimentícia, reduzindo assim a aceitação sensorial dos produtos (FÁVARO-TRINDADE, 2011).

A técnica de microencapsulação tem sido bastante utilizada como uma alternativa para assegurar a viabilidade e as propriedades funcionais conferidas pelos microrganismos probióticos durante o processamento e o período de vida de prateleira dos produtos (FÁVARO-TRINDADE, 2011).

Shahidi e Han (1993) definiram microencapsulação como um processo em que uma membrana envolve pequenas partículas de sólidos, gotículas de líquidos ou misturas gasosas, com o objetivo de proteger o material de condições ambientais adversas, tais como umidade, oxigênio, luz, e interações com outros compostos. A microencapsulação também promove a liberação controlada dos compostos envolvidos. De maneira sucinta, pode-se dizer que a técnica de microencapsulação segrega as células do ambiente exterior (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Nem todas as técnicas de microencapsulação são adequadas a microrganismos probióticos. Algumas fazem uso de solventes orgânicos ou agentes microencapsulantes não GRAS (Generally Recognized as Safe), que podem ser tóxicos aos microrganismos. Outro fator limitante é o tamanho das células probióticas (1-5 µm) que impede o uso de algumas técnicas (FÁVARO-TRINDADE, 2011).

O custo também deve ser levado em consideração. Gouim (2004) sugere que para ser economicamente viável, o custo adicional ao alimento conferido pelo ingrediente microencapsulado não deve ultrapassar €0,1 /kg.

Dentre as técnicas utilizadas para microencapsular probióticos, destacam-se a extrusão, emulsão, coacervação, atomização ou *spray drying* e leito fluidizado ou *spray coating* (FÁVARO-TRINDADE, 2011).

O material utilizado como encapsulante, também chamado de “material de parede”, é de suma importância para a manutenção da viabilidade e propriedades funcionais do

microrganismo probiótico, além de influenciar sua liberação para o ambiente externo no momento certo (FÁVARO-TRINDADE, 2011). Os materiais mais comumente utilizados como agentes encapsulantes são alginatos, gomas extraídas de espécies de algas ou bactérias, quitosanas, amidos, carragenas, gelatinas, proteínas lácteas, gorduras, etc. (BURGAIN *et al.*, 2011; YING *et al.*, 2010).

Dependendo da técnica de microencapsulação adotada, se faz necessária a associação a um processo adicional de desidratação, possibilitando o aumento da viabilidade das microcápsulas obtidas. No entanto, muita cautela deve ser tomada ao se escolher o método de desidratação, tendo em vista que altas temperaturas podem ser danosas às células. A técnica de liofilização promove a retirada da umidade através da sublimação, processo em que a água é transferida do estado sólido diretamente para o estado gasoso, mediante condição de vácuo. Para isso é necessário o congelamento prévio do produto a ser liofilizado. Como não há utilização de altas temperaturas, o dano sobre as células é minimizado (IBARZ; BARBOSA-CANOVAS, 1999).

2.5.1 Técnica de extrusão

A técnica de microencapsulação por extrusão é a mais popularmente empregada, já que apresenta baixo custo e simplicidade, além de não envolver altas temperaturas (FÁVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011).

Nessa técnica, a microencapsulação ocorre através da gelificação de um polissacarídeo aniônico, que, ao entrar em contato com o cálcio ou outro íon multivalente imobiliza os microrganismos (CUI *et al.*, 2000). Polímeros solúveis e insolúveis em água são utilizados como material encapsulante. Apesar de o alginato ser o polímero mais amplamente utilizado nessa técnica, carragena, pectina e goma gelana também são opções viáveis (DOLEYRES; LACROIX, 2005; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2003).

As microcápsulas obtidas através desse método podem ser chamadas de *beads*, e seu tamanho pode alcançar desde micrômetros até milímetros. Quanto menor o tamanho dos *beads*, melhor é o seu escoamento e dispersão no alimento. Além disso, é importante que a

textura do alimento não seja prejudicada, constituindo um importante motivo para que as microcápsulas permaneçam na faixa dos micrômetros (FÁVARO-TRINDADE, 2011).

As principais etapas da extrusão envolvem a preparação da solução do material de parede (normalmente alginato de sódio), a adição dos microrganismos, e a extrusão desta suspensão, através de uma seringa, na solução de endurecimento (normalmente cloreto de cálcio) (KRASAEKOOPT *et al.*, 2003; MENEZES *et al.*, 2013). A concentração de alginato e da solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) indicada para a formação das microcápsulas varia de 0,6 a 2%, e 0,05 a 1,5 M, respectivamente (KRASAEKOOPT *et al.*, 2003).

Apesar de as cápsulas de alginato aumentarem a viabilidade dos probióticos, sabe-se que o uso de alginato como material de parede confere porosidade às capsulas obtidas. Dessa forma, é possível que haja migração de material microencapsulado para o meio externo ou penetração do suco gástrico e de outras substâncias inibitórias para o interior da cápsula, resultando em perda de viabilidade das células. Para amenizar essa perda, é possível incorporar outras substâncias à solução de alginato, como por exemplo, a inulina e a goma xantana, ou ainda aplicar uma cobertura sobre as microcápsulas. Para a cobertura, são utilizadas soluções de ácido esteárico, cera de abelha, quitosana, goma gelana, goma locusta, carragena, entre outros ingredientes (MANDAL *et al.*, 2014).

A técnica de microencapsulação por extrusão ainda apresenta dificuldades a serem contornadas, para sua aplicação em escala industrial. Um ponto importante é a produtividade, que se apresenta baixa, mesmo em escala laboratorial (PICOT; LACROIX, 2003).

2.5.2 Técnica de coacervação complexa

Existem dois tipos de técnica de coacervação: a simples e a complexa. A simples consiste na evaporação do solvente que envolve as moléculas de um colóide, por meio da adição de outro solvente eletrolítico (sais ou alcoóis, por exemplo), no qual o colóide é insolúvel. Já a complexa consiste na combinação de duas soluções de hidrocolóides de cargas opostas, que interagem entre si gerando a precipitação de polímeros complexos (KESTER *et al.*, 1986). Como o precipitado é obtido a partir de uma solução aquosa, é necessária, para

estender a vida útil das microcápsulas obtidas, a associação da técnica a um processo de desidratação (FÁVARO-TRINDADE, 2011), como por exemplo, a liofilização.

Para a execução da técnica de coacervação complexa, devem ser utilizados biopolímeros com propriedades coloidais, densidade de cargas adequadas e cadeias lineares. Sistemas interessantes obtidos através da técnica de coacervação complexa são aqueles formados entre proteínas e polissacarídeos iônicos de cargas opostas, como por exemplo, a caseína e pectina, β -lactoglobulina e caseína, entre outros (GIRARD *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2007).

Dentre os diversos materiais de parede que podem ser utilizados, a pectina, polissacarídeo encontrado em frutos e em tecidos jovens como cascas de frutas cítricas, é considerada pouco sensível a agentes químicos além de apresentar maior resistência a ácidos e ao ambiente intestinal (BRANDÃO; ANDRADE, 1999; PARKAR *et al.*, 2010). A caseína, glicofosfoproteína encontrada no leite, tem sido bastante estudada pela sua aplicação como material de parede ou cobertura em processos de microencapsulação, justamente por sua capacidade formadora de filme, ausência de toxicidade e natureza anfipática (carga negativa acima de seu ponto isoelétrico e carga positiva abaixo deste) (WURTH, *et al.*, 2015).

A coacervação complexa é considerada um método vantajoso por se tratar de um processo relativamente simples, de baixo custo, onde não são utilizadas altas temperaturas nem solventes orgânicos. A técnica ainda permite a incorporação de uma grande quantidade de microrganismo em relação ao material encapsulante. No entanto, também existe a dificuldade de transferir a técnica para escala industrial, já que o coacervado é obtido em solução aquosa através de um processo em batelada (FÁVARO-TRINDADE, 2011).

3 CONCLUSÃO

O uso de microrganismos probióticos para reduzir a incidência de doenças associadas à cavidade oral é promissor, considerando o potencial efeito de modulação da microbiota e inibição de patógenos. O desenvolvimento de alimentos que permaneçam maior período de tempo em contato com a cavidade oral e que sejam bons veículos para probióticos se faz necessário, como uma forma de maximizar os efeitos benéficos.

4 BIBLIOGRAFIA

ANVISA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos.** Jul. 2008. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov>>. Acesso em: 28 mar. 2015.

ARVANITOYANNIS, I. S.; HOUWELINGENKOUKALIAROGLOU, M. V. Functional foods: a survey of health, claims pros and cons, and current legislation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, p. 385-404, 2005.

BALLAI, S.; LANCIAI, F. Functional food and diabetes: a natural way in diabetes prevention? **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 63, p.51-61, 2012.

BIGLIARDI, B.; GALATI, F. Trends in the food industry: The case of functional foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.31, p. 118-129, 2013.

BIZZINI, B.; PIZZO, G.; SCAPAGNINI, G.; NUZZO, D.; VASTO, S. Probiotics and Oral Health. **Current Pharmaceutical Design**, v.18,p.5522-5531, 2012.

BRANDÃO, E.M.; ANDRADE, C.T. Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p.38-44, 1999.

BURGAIN, J. J.; GAIANI, C. C.; LINDER, M. R.; SCHER, J. J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v.104, p. 467–483, 2011.

BURTON, J. P.; DRUMMOND, B. K.; CHILCOTT, C. N.; TAGG, J. R.; THOMSON, W. M.; HALE, J. D. F.; WESCOMBE, P. A. Influence of the probiotic *Streptococcus salivarius* strain M18 on indices of dental health in children: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. **Journal of Medical Microbiology**, v.62, p. 875-884, 2013

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, p. 314-318, 2006.

ÇAGLAR, E.; KARGUL B.; TANBOGA I. Bacteriotherapy and probiotics role on 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 Investigation**, v. 11, p. 425-429, 2007.

ÇAGLAR, E.; KUSCU, O. O.; KUVVETLI, S. S.; CILDIR, S. K.; SANDALI, N. A.; 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.

CAMPUS, G.; COCCO, F.; CARTA, G.; SIMARK-MATTSON, C.; STROHMENGER, L.; LINGSTRÖM, P. Effect of a daily dose of *Lactobacillus brevis* CD2 lozenges in high caries risk schoolchildren. **Clinical Oral Investigation**, v. 18, p. 555-556, 2014.

CAVALLINI, D. C. U.; ABDALLA, D. S. P.; VENDRAMINI, R. C.; BEDANI, R.; BONDESPACHO, L. Q.; PAULY-SILVEIRA, N. D.; VALDEZ, G. F.; ROSSI, E. A. Effects of isoflavone-supplemented soy yogurt on lipid parameters and atherosclerosis development in hypercholesterolemic rabbits: a randomized double-blind study. **Lipids in Health and Disease**, v.8, p.1-10, 2009b.

CAVALLINI, D. C. U.; BEDANI, R.; PAULY, N. D.; BONDESPACHO, L. Q.; VENDRAMINI, R. C.; ROSSI, E. A. Effects of probiotic bacteria, isoflavones and simvastatin on lipid profile and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Lipids in Health and Disease**, v.8, p.1, 2009a.

CAVALLINI, D. C. U.; SUZUKI, J. Y.; ABDALLA, D. S. P.; VENDRAMINI, R. C.; PAULY-SILVEIRA, N. D.; ROSELINO, M. N.; PINTO, R. A.; ROSSI, E. A. Influence of a probiotic soy product on fecal microbiota and its association with cardiovascular risk factors in an animal model. **Lipids in Health and Disease**, v.10, p.126, 2011.

CAVALLINI, D. C. U.; CELIBERTO, L. S.; ROSELINO, M. N.; BEDANI, R.; PAULY-SILVEIRA, N. D.; VALDEZ, G. F.; PINTO, R. A.; ROSSI, E. A. 2013. **Effect of a probiotic fermented soy product on colonic inflammation in dextran sodium sulfate-induced colitis in rats**. 7 th Probiotics & Prebiotics new foods, Rome, 2013.

CAVALLINI, D.C.U.; BEDANI, R.; BOMDESPACHO, L.Q.; VENDRAMINI, R.C.; ROSSI, E.A. Effects of probiotic bacteria, isoflavones and simvastatin on lipid profile and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: a randomized double-blind study. **Lipids in Health and Disease**, v. 8, p.1-8, 2009.

CEAPA, C.; WOPOREIS, H.; REZAIKI, L.; KLEEREBEZEM, M.; KNOL, J.; OOZEER, R. Influence of fermented milk products, prebiotics and probiotics on microbiota composition and health. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.27, p.139-155, 2013.

CELIBERTO, L. S.; ROSELINO, M. N.; BEDANI, R.; ROSSI, E. A.; PINTO, R. A.; PAULY-SILVEIRA, N. D.; VALDEZ, G. F; CAVALLINI, D. C. U. **Effect of a probiotic soy beverage and sulfasalazine on fecal microbiota of animals with colitis induced by dextran- sodium sulfate**. 7 th Probiotics & Prebiotics new foods, Rome, 2013.

CELIBERTO, L.S. **Efeito de uma bebida probiótica (*Enterococcus faecium* CRL 183 e *Bifidobacterium longum* ATCC 15707) à base de extrato aquoso de soja no desenvolvimento de colite quimicamente induzida em ratos**. 2014. 105f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2014.

COMELLI, E. M.; GUGGENHEIM, B.; STINGELE, F.; NESSER, J. R. Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health. **European Journal of Oral Sciences**, v.110, p.218-224, 2002

CUI, J. H.; GOH, J. S.; KIM, P. H.; CHOI, S. H.; LEE, B. J. Survival and stability of bifidobacteria loaded in alginate poly-L-lysine microparticles. **International Journal of Pharmaceuticals**, v.210, p.51-59, 2000.

DUNCAN, S. H.; FLINT, H. J. Probiotics and Prebiotics and health in ageing population **Maturitas** v.75, p.44-50, 2013.

EDWARDS, W.P. Introduction. In: EDWARDS, W.P **The science of sugar confectionery**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, p.2-3, 2001.

ERKKILÄ, S.; PETÄJÄ, E.; EEROLA, S.; LILLEBERG, L.; MATTILA-SANDHOLM, T.; SUINKO, M. L.; Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter culture. **Meat Science**, v.58, p.111-116, 2001.

FAO/WHO. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001, 34p. Disponível em <http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf>. Acesso em 27 mar. 2015. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation].

FAO/WHO. Joint of FAO/WHO Working Group. **Report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food**. London, Ontario, Canada, 30 de abril e 1º maio, 2002

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Encapsulação de culturas probióticas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos (SBCTA)**, v.37(supl), p.88-94, 2003.

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, p. 1–8, 2011.

FÁVARO-TRINDADE, C.S. Microencapsulação de probióticos. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F (Org.). **Probióticos e Prebióticos em Alimentos**. São Paulo: Ed. Varela, 2011, p. 239-254

FOLIGNÉ, B.; DANIEL, C.; POT, B. Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. **Current Opinion in Microbiology**, v.16, p.284-292, 2013.

FULLER, R. Probiotics in man and animal. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.365-378, 1989.

GIRARD, M.; TURGEON, S. L.; GAUTHIER, S. F. Thermodynamic parameters of β -lactoglobulin–pectin complexes assessed by isothermal titration calorimetry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4450–4455, 2003.

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

GRUDIANOV, A.I.; DMITRIEVA, N. A.; FOMENKO, E. V. Use of probiotics Bifidumbacterin and Acilact in tablets in therapy of periodontal inflammations. **Stomatologiia** v.81, p. 39-43, 2002.

GULAT, M.; ANAND, V.; JAIN, N.; ANAND, B.; BAHUGUNA, R.; GOVILA, V. Essentials of periodontal medicine in preventive medicine. **International Journal of Preventive Medicine**, v.4, p. 988–994, 2013.

HALLSTRÖM, H.; LINDGREN, S.; YUCEL-LINDBERG, T.; DAHLÉN, G.; RENVERT, S.; TWETMAN, S. Effect of probiotic lozenges on inflammatory reactions and oral biofilm during experimental gingivitis. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.71, p. 828-833, 2013.

HATAKKA, K.; SAVILAHTI, E.; PÖNKÄ, A.; MEURMAN, J.H.; POUSSA, T.; NÄSE, L.; SAXELIN, M.; KORPELA, R. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. **BMJ**, v.322, p.1-5, 2001.

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

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.11, p.506–514, 2014.

HILTON, E.; ISENBERG, H. D.; ALPERSTEIN, P.; FRANCE, K.; BORENSTEIN, M. T. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candidal vaginitis. **Annals of Internal Medicine**, v.116, p.353-357, 1992.

IBARZ, A.; BARBOSA-CANOVAS, G. V. **Deshidratación y Operaciones Unitarias en la Ingeniería de Alimentos**, Lancaster, Basel, 1999.

JORGE, A. O. C. Microbiologia Bucal, 3ª edição, Editora Santos, 2007.

- KALE-PRADHAN, P. B.; JASSAL, H. K.; WILHELM, S.M. Role of *Lactobacillus* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a meta analysis. **Pharmacotherapy**, v.30, p.119-126, 2010.
- KANG, M. S.; KIM, B. G.; CHUNG, J.; LEE, H.; OH, J. S. Inhibitory effect of *Weissella cibaria* isolates on the production of volatile sulphur compounds. **Journal of Clinical Periodontology**, v.33, p.226-232, 2006.
- KAZOR, C. E.; MITCHELL, P. M.; STOKES, L. N.; SOESCHE, W. J.; DEWHIRST, F. E.; PASTER, B. J. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p. 558-563, 2003.
- KESTER, J. J.; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: a review. **Food Technology**, v.10, p.4759, 1986.
- KINOUCHI, F.L. “**Iogurte**” de soja como coadjuvante no tratamento de câncer de mama. 2006. 85 f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.
- KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, v.13, p.3-13, 2003.
- LEE, K. Y.; HEO, T. R. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salts solution. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p. 869–873, 2000.
- LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay. **Microbiological Reviews**, v.50, p. 353-380, 1986.
- LÓPEZ-RUBIO, A.; SANCHEZ, E.; SANZ, Y.; LAGARON, J. M. Encapsulation of living Bifidobacteria in Ultrathin PVOH electrospun fibers. **Biomacromolecules**, v.10, p.2823-2829, 2009.
- MANDAL, S.; HATI, S.; PUNIYA, A. K.; KHAMRUI, K.; SINGH, K. Enhancement of survival of alginate-encapsulated *Lactobacillus casei* NCDC 298. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.10, p.1994-2001, 2014.

MARSH, P. MARTIN, M. **Microbiologia Oral**. 4rd. Ed Santos, 2005.

MENEZES, C. R.; BARIN, J. S.; CHOCOSKI, A. J.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, v.43, jul 2013.

MORIYA, S.; ANDO, Y.; MIURA, H. Trends and prospects of oral health conditions among Japanese: The achievement of 8020. **Journal of the National Institute of Public Health**, v.60, p. 379–386, 2011.

NÄSE, L.; HATTAKKA, K.; SAVIHAHTI, E.; SAXELIN, M.; PONKA, 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.

PARKAR, S. G.; REDGATE, E. L; WIBISONO, R.; LUO, X.; KOH, E. T. H.; SCHRODER, R. Gut health benefits of kiwifruit pectins: Comparison with commercial functional polysaccharides. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 210–218, 2010.

PERDIGON, G.; ALVAREZ, S.; RACHID, M.; AGÜERO, G.; GOBBATO, N. Immune system stimulation by probiotics. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.1597-1606, 1995.

PICOT, A.; LACROIX, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt **International Dairy Journal**, v. 14 , p. 505–515, 2004.

POSSEMIERS, S.; MARZORATI, M.; VERSTRAETE, W.; VAN DE WIELE, T. Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p. 97–103, 2010.

PROZYN. Produtos com baixa lactose. **Informação técnica**. São Paulo, 2010.

PUUPPONEN-PIMIA, R.; AURA, A. M.; OKSMAN-CALDENTY, K. M.; MYLLARINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K.

Development of functional ingredients for gut health. **Trends in Food Science and Technology**, v.13, p.3-11, 2002.

RAMOND C. R. Formulating fortunes-the tale of medicated lozenges. **Drug discovery today**.v.7, 286-287, 2002.

RICCIA, D. N.; BIZZINI, F.; PERILLI, M. G.; POLIMENI, A.; TRINCHIERI, V.; AMICOSANTE, G.; CIFONE, M. G. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. **Oral Diseases**, v.13, p.376-385, 2007.

RIVIERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-diary probiotic products. **Food Microbiology**, v.27, p.1-11, 2010.

ROBERFROID, M. B. Inulin-type fructans: functional food ingredients. **Journal of Nutrition**, v.137, p.2493S-2502S, 2007.

ROSSI, E. A.; CAVALLINI, D. C. U.; CARLOS, I. Z.; VENDRAMINI, R. C.; DÂMASO, A. R.; VALDEZ, G. F. Intake of isoflavone-supplemented soy yogurt fermented with *Enterococcus faecium* lowers serum total cholesterol and non-HDL cholesterol of hypercholesterolemic rats. **European Food Research and Technology**, v.228, p.275-282, 2008.

ROSSI, E. A.; VENDRAMINI, C. R.; CARLOS, I. Z.; OLIVEIRA, M. G.; VALDEZ, G. F. Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre lípides séricos de homens adultos normocolesterolêmicos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 53, p.47-51, 2003.

ROSSI, E. A.; VENDRAMINI, R. C.; CARLOS, I. Z.; UEIJI, I. S.; SQUINZARI, M. M.; SILVA JÚNIOR, S. I.; VALDEZ, G. F. Effects of a Novel Fermented Soy Product on the Serum Lipids of Hypercholesterolemic Rabbits. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.74, p.213-216, 2000.

SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J. M.; BRESSOLLIER, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT – Food Science and Technology**, v.50, p.1-16, 2013.

SAAVEDRA, J. M. Clinical application of probiotic agents. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 1147S-1151S, 2001.

- SAAVEDRA, L.; TARANTO, M. P.; SESMA, F.; VALDEZ, G. F. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p.241-245, 2003.
- SAMOT, J.; BADET, C. Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health. **Anaerobe** v.19, p. 34-38, 2013.
- SHA, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v.17, p.1262-1277, 2007.
- SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.33, p. 501-547, 1993.
- 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 Technology**, v.228, p.231-237, 2008.
- SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and yoghurt. **International Journal of Food Microbiology**, v.62, p.47-55, 2000.
- SUNOHARA, H.; OHNO, T.; SHIBATA, N.; SEKI, K. **Process for producing capsule and capsule obtained thereby**. US Patent 5:478-570, 1995.
- SUZUKI, N.; YONEDA, M.; HATANO, Y.; IWAMOTO, T.; MASUO, Y.; HIROFUJI, T. *Enterococcus faecium* WB2000 Inhibits Biofilm Formation by Oral Cariogenic Streptococci. **International Journal of Dentistry**, v. 2011, p.1-5, 2011.
- TERAI, T.; OKUMURA, T.; IMAI, S.; NAKAO, M.; YAMAJI, K.; ITO, M. Screening of Probiotic Candidates in Human Oral Bacteria for the Prevention of Dental Disease. **Plos One**, v. 10, p.1-20, 2015.
- TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 225–241, 2014.

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

VISHNU, H.P. Probiotics and Oral Health. In: VIRDI, M. **Oral Health Care – Pediatric, Research, Epidemiology and Clinical Practices**. Prof. Mandeep Virdi (Ed.), In Tech, 2012, p. 195-204.

WANG, X.; WANG, Y .W.; RUENGRUGLIKIT, C.; HUANG, Q. Effects of salt concentration on formation and dissociation of β - lactoglobulin/pectin complexes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 10432–10436, 2007.

WURTH, R.; HORMANNSPERGER, G.; WILKE, J.; FOERST, P.; HALLER, D.; KULOZIK, U. Protective effect of milk protein based microencapsulation on bacterial survival in simulated gastric juice versus the murine gastrointestinal system. **Journal of functional Foods**, v. 15, p.116-125, 2015.

YEE, R.; SHEIHAM, A. The burden of restorative dental treatment for children in Third World countries. **International Dental Journal**, v.52, p. 7-10, 2002.

YING, D. Y.; PHOON, M. C.; SANGUANSRI, L.; WEERAKKODY, R.; BURGAR, I.; AUGUSTIN, M. A. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG powders: Relationship of powder physical properties to probiotic survival during storage. **Journal of Food Science**,v. 75, p.588–595, 2010.

CAPÍTULO II

**Desenvolvimento e caracterização de uma pastilha potencialmente
probiótica**

RESUMO

O crescente interesse pelos efeitos locais dos microrganismos probióticos, incluindo a proteção contra o desenvolvimento de cáries dentárias, tem estimulado a incorporação de tais microrganismos a alimentos veículos não convencionais como sorvetes, gomas de mascar, balas e pastilhas. O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento e a caracterização de uma pastilha alimentícia *diet* contendo a cepa probiótica *Enterococcus faecium* CRL 183 e a avaliação do potencial da cepa probiótica em sobreviver em saliva humana e inibir a multiplicação da cepa patogênica *Streptococcus mutans* ATCC 25175. O microrganismo *E. faecium* CRL183 foi microencapsulado através das técnicas de extrusão e coacervação em matriz complexa. A técnica de coacervação complexa apresentou o melhor desempenho em relação à manutenção da viabilidade durante o período de armazenamento à temperatura ambiente (23°C), sendo selecionada para a próxima etapa do estudo – produção das pastilhas potencialmente probióticas. As pastilhas foram processadas em três tratamentos: PC – pastilha controle, sem adição do probiótico; PPP1 – com adição do microrganismo probiótico e PPP2 – pastilha com adição do microrganismo probiótico e de inulina (prebiótico). Análises microbiológicas (viabilidade e segurança), físico-químicas (umidade, atividade de água, pH e cor) e sensoriais (testes de aceitação e intenção de compra) foram conduzidas imediatamente após o preparo (T0) e ao longo do tempo de estocagem. A sobrevivência do probiótico à saliva e a inibição da multiplicação da cepa patogênica (*S. mutans* ATCC 25175), foram avaliadas através da inoculação da cepa pura e das pastilhas em saliva e da técnica de difusão em poços, respectivamente. A cepa *E. faecium* teve sua viabilidade reduzida imediatamente após a produção das pastilhas e durante o tempo de armazenamento à temperatura ambiente, com população de células viáveis de $5,53 \pm 0,05$ UFC/g e $4,83 \pm 0,01$ UFC/g no tempo inicial e de $1,86 \pm 0,07$ UFC/g e $1,16 \pm 0,28$ UFC/g ao final de 28 dias, para os tratamentos PPP1 e PPP2, respectivamente. As pastilhas apresentaram médias de aceitação superiores a seis (gostei ligeiramente a gostei moderadamente) para os atributos aroma, textura e impressão global, sem diferirem significativamente entre si ($p < 0,05$). A adição da cepa probiótica e da substância prebiótica reduziu a aceitação do produto em relação à aparência e cor e melhorou a impressão dos consumidores em relação ao sabor. As análises físico-químicas revelaram que as formulações PC, PPP1 e PPP2 não diferiram entre si ($p < 0,05$) em relação aos parâmetros: atividade de água ($0,79 \pm 0,01$; $0,77 \pm 0,02$; $0,75 \pm 0,02$), umidade ($2,31 \pm 0,07$; $2,12 \pm 0,07$;

1,99±0,06) e pH (6,28±0,08; 6,25±0,05; 6,23±0,07), mas apresentaram diferença significativa com relação ao parâmetro cor (L*: 92,77±0,90; 85,84±0,92; 88,64±0,78; a*: -0,20±0,07; 0,38±0,09; 0,51±0,09; b*: 1,30±0,08; 7,00±0,29; 8,13±0,39). Todos os tratamentos apresentaram características microbiológicas adequadas aos padrões estabelecidos para confeitos, durante os 28 dias de estudo. A cepa *E. faecium* CRL183 inoculada em saliva humana na forma de células livres, apresentou aumento de 0,82 ciclos logarítmicos após 24 horas de incubação, enquanto que as pastilhas PPP1 e PPP2 no tempo inicial apresentaram aumento de 3,64 e 3,31 ciclos logarítmicos, respectivamente, após o mesmo intervalo de tempo. O teste de difusão em poços evidenciou que a cepa probiótica foi capaz de inibir a multiplicação de *S. mutans* ATCC 25175 nas condições do estudo. Os resultados obtidos indicam que a associação do probiótico com inulina melhorou a aceitação do produto em relação ao atributo sabor e que a cepa probiótica sobrevive à saliva humana e apresenta potencial para inibir a multiplicação do microrganismo causador de cárie dental – *S. mutans* ATCC 25175. No entanto, a queda brusca da viabilidade da cepa probiótica durante o armazenamento das pastilhas, indica a necessidade de aprimoramento do processo de obtenção das mesmas, além de adequação da embalagem utilizada à matriz alimentícia.

Palavras chave: *Enterococcus faecium*, análise sensorial, viabilidade, probiótico, pastilha, *S. mutans*.

ABSTRACT

The increasing interest by local effects of probiotic microorganisms, including protecting against the development of dental caries, has stimulated the incorporation of such microorganisms in food non-conventional vehicles such as ice cream, chewing gum, candies and lozenges. The main purpose of this study was the development and characterization of a diet lozenge containing the probiotic strain *Enterococcus faecium* CRL 183. Its potential of surviving in the human saliva environment and the inhibition of the pathogenetic strain *Streptococcus mutans* ATCC 25175, were also evaluated. The probiotic strain *E. faecium* CRL 183 was microencapsulated through the extrusion and complex coacervation techniques. The last one, was selected to the next step of the study (lozenges production), as it showed the best performance in comparison to the extrusion technique, regarding to viability maintenance during the storage period at room temperature. The lozenges were produced through three different treatments: PC – control formulation, without the probiotic; PPP1 – probiotic formulation; PPP2 – probiotic formulation with inulin addition. Microbiologic (viability and security), physicochemical (moisture, water activity, pH and color) and sensorial (acceptance and purchase intention) analyses were conducted during the storage period. The probiotic survival to human saliva was evaluated through inoculation of both, the pure probiotic strain and the probiotic lozenges in saliva. The agar diffusion technique was used to evaluate the *E. faecium* CRL 183 inhibition potential against the pathogenic strain, *S. mutans* ATCC 25175. The probiotic strain had the viability decreased after the lozenges production and also during the storage period at room temperature: 5.53 ± 0.05 UFC/g and 4.83 ± 0.01 UFC/g at initial time and 1.86 ± 0.07 UFC/g and 1.16 ± 0.28 UFC/g after 28 days of storage, for the PPP1 and PPP2 treatments, respectively. The lozenges showed acceptance scores higher than 6 to flavor, texture and global impression attributes, with no significant difference among them ($p < 0.05$). The addition of the probiotic strain and the prebiotic ingredient reduced the product acceptance regarding appearance and color and improved the flavor impression. The physicochemical analysis revealed that the formulations PC, PPP1 and PPP2 did not differed among themselves concerning the following parameters: water activity (0.79 ± 0.01 ; 0.77 ± 0.02 ; 0.75 ± 0.02), moisture (2.31 ± 0.07 ; 2.12 ± 0.07 ; 1.99 ± 0.06) and pH (6.28 ± 0.08 ; 6.25 ± 0.05 ; 6.23 ± 0.07). But there was difference concerning the color parameter (L^* : 92.77 ± 0.90 ; 85.84 ± 0.92 ; 88.64 ± 0.78 ; a^* : -0.20 ± 0.07 ; 0.38 ± 0.09 ; 0.51 ± 0.09 ; b^* : 1.30 ± 0.08 ;

7.00 ± 0.29; 8.13 ± 0.39). The microbiologic results obtained during the storage period, were appropriated to the confectionery category. The *E. faecium* strain inoculated in saliva as free cells had the cell viability increased in 0.82 logarithmic cycles after 24 h of incubation, whereas the lozenges PPP1 and PPP2 formulations at initial time had the cell viability increased by 3.64 and 3.31 logarithmic cycles, respectively, the same period. The diffusion test showed that the probiotic strain was able to inhibit the growth of *S. mutans* ATCC 25175 in the study conditions. The results suggested that the association of probiotic microorganism and inulin improved the acceptance of the product, in relation to the flavor attribute, and that the probiotic strain survived in the human saliva and has potential to inhibit the multiplication of dental caries-causing organism – *S. mutans* ATCC 25175. However, the drastic viability reduction during the storage period indicates the necessity of a process refinement and also the adjustment of the packaging to food matrix.

Keywords: *Enterococcus faecium*, sensorial analysis, viability, probiotic, lozenges, *S. mutans*.

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos funcionais são aqueles capazes de promover a saúde através de mecanismos não previstos na nutrição convencional, enfatizando-se que tal efeito limita-se à promoção da saúde e não à cura de doenças (ROBERFROID, 2007). Características da própria matriz alimentícia ou a adição de ingredientes contendo compostos bioativos fazem do alimento um produto funcional (ARVANITOYANNI, HOUWELINGENKOUKALIAROGLOU, 2005). Microrganismos probióticos são comumente adicionados a alimentos com esse mesmo propósito.

Probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (HILL *et al.*, 2014).

Entre os efeitos benéficos atribuídos à ingestão de probióticos estão a redução de risco de doenças gastrintestinais, modulação da resposta imune e do perfil lipídico e redução do desenvolvimento de cânceres. (CAVALLINI *et al.*, 2013; CELIBERTO *et al.*, 2013 ; KALEPRADHAM *et al.*, 2010 ; SAAVENDRA, 2001). A cepa *Enterococcus faecium* CRL 183, utilizada no presente estudo, foi isolada de queijo Tafi (queijo caseiro tradicional de terras altas, na província de Tucumán, Argentina) e possui várias propriedades comprovadas cientificamente como: modulação do perfil lipídico, da microbiota intestinal e do sistema imune, redução do risco de câncer de cólon e de mama e melhora dos sintomas relacionados à colite ulcerativa (CAVALLINI *et al.*, 2009a,b, 2011; CELIBERTO, 2014; KINOUCHI, 2006; ROSSI *et al.*, 2000, 2003, 2008; SIVIERI *et al.*, 2008).

O tema probióticos e a saúde bucal tem estimulado novas pesquisas nos últimos anos. Estudos indicam que probióticos proporcionam importantes benefícios para a cavidade oral, como atividade anticariogênica, tratamento de doenças periodontais e halitose e redução na população de microrganismos envolvidos em patologias bucais (HAUKIOJA, 2010). Apesar dos inúmeros efeitos benéficos atribuídos à cepa *E. faecium* CRL183, o seu comportamento frente à cavidade oral ainda não foi avaliado.

Para ser considerado probiótico é necessário que o alimento apresente 8 a 9 log UFC/g (unidades formadoras de colônia por grama) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante (ANVISA, 2008). Além disso, é indispensável

que a cepa probiótica não só apresente segurança para o consumo humano (FAO/WHO, 2002), mas também que resista às condições adversas, tais como variações de pH e temperatura e exposição ao oxigênio, tanto durante o processamento tecnológico e período de estocagem, como durante o trânsito gastrointestinal (FOLIGNÉ, *et al.*, 2013). É dentro desse contexto que reside o desafio para a maioria dos pesquisadores, tendo em vista que os microrganismos probióticos podem apresentar sensibilidade a tais condições adversas citadas, sendo essa característica cepa dependente (SHA, 2007). É importante ressaltar que a cepa *E. faecium* CRL 183, utilizada nesse estudo, apresenta segurança para o consumo humano e resistência ao trânsito gastrointestinal, entretanto, o efeito local de tal microrganismo ainda não foi avaliado (SAAVEDRA *et al.*, 2003).

A microencapsulação – técnica que permite recobrir diferentes partículas, formando microcápsulas - constitui uma alternativa para melhorar a resistência e preservar a viabilidade dos microrganismos probióticos durante as diferentes etapas de processamento, estocagem e passagem pelo trato gastrointestinal (FÁVARO-TRINDADE, 2011).

Também é importante ressaltar, que a maior parte dos alimentos contendo microrganismos probióticos é constituída por derivados lácteos fermentados, uma vez que estudos indicam que essa é a matriz mais adequada à veiculação de tais microrganismos (ERKKILÄ *et al.*, 2001; POSSEMIERS *et al.*, 2010). No entanto, o crescente número de consumidores intolerantes à lactose em várias populações do mundo, associado à tendência do vegetarianismo tem gerado uma demanda mundial pelo desenvolvimento de alimentos probióticos em outras matrizes (GRANATO *et al.*, 2010). Portanto, há uma tendência mundial de diversificação desse segmento, através da incorporação de microrganismos probióticos em matrizes não lácteas e não fermentadas (POSSEMIERS *et al.*, 2010; RIVIERA-ESPINOZA, GALARDO-NAVARRO, 2010).

Versáteis e simples de serem produzidas, as pastilhas são confeitos comercializados tanto pela indústria farmacêutica como pela indústria alimentícia (EDWARDS, 2001). Ao se desintegrarem lentamente na boca, possibilitam não só a sensação de frescor, mas também a liberação de diversos compostos. Sendo assim, o confeito em questão apresenta-se como um veículo em potencial para o transporte de microrganismos probióticos. Considerando o tempo necessário para completar a dissolução do produto na cavidade oral, uma pastilha probiótica

poderia exercer, também, um efeito local, como redução de risco de desenvolvimento de cáries dentais e de outras patologias orais.

Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento e a caracterização de uma pastilha *diet* potencialmente probiótica, com adição de *E. faecium* CRL 183 microencapsulado e liofilizado. Adicionalmente, foi realizado o estudo da capacidade de sobrevivência na saliva e do potencial anticariogênico da cepa probiótica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Pastilhas *diet* contendo a cepa probiótica *E. faecium* CRL 183, (proveniente do Centro de Referência para Lactobacilos - CERELA, Argentina), produzidas no Laboratório de Pesquisa em Probióticos (LPP) do Departamento de Alimentos e Nutrição - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara.

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação da cultura probiótica

Reativação e Propagação da Cultura Probiótica

As células de *E. faecium* CRL 183 foram repicadas semanalmente (a partir de uma cultura estática estoque, mantida à temperatura de -80°C , em leite esterilizado adicionado de extrato de levedura, glicose e glicerol) em caldo MRS, (Man Rogosa and Sharp/ Acumedia, EUA) na concentração de 10% (v/v, ou seja, 1 mL de inóculo em 10 mL de caldo), sendo a incubação realizada a $37^{\circ}\text{C}/16\text{ h}$.

Microencapsulação e Liofilização da Cultura Probiótica

A microencapsulação da cultura probiótica de *E. faecium* CRL 183 foi realizada por dois métodos distintos:

- **Método 1 (M1):** Extrusão, segundo a metodologia proposta por Lee *et al.*, (2004) com modificações. A suspensão do microrganismo probiótico (20%, contendo 8,99 log UFC/g – unidades formadoras de colônias por grama) mantida em caldo MRS foi incorporada, sob agitação constante e em condições assépticas, a uma solução estéril contendo alginato de sódio (Synth, Brasil) (2%), glicerol (Synth, Brasil) (crioprotetor) (5%), caldo MRS (Acumedia, EUA) (5,5%), goma xantana (Synth, Brasil) (0,26%), Tween 20 (Synth, Brasil) (0,1%) e inulina GR (1%). Após completa homogeneização, a mistura obtida foi gotejada em uma solução de cloreto de cálcio (Vetec, Brasil) 0,5 mol/L (7,4%), com o auxílio de uma seringa de vidro acoplada a uma agulha. As cápsulas formadas permaneceram em repouso por um período de 15 min. para endurecimento, e em seguida, foram lavadas com água destilada, filtradas e acondicionadas em frascos estéreis. Todas as soluções e materiais utilizados foram previamente esterilizados a 121°C, por 15 min.

- **Método 2 (M2):** Coacervação complexa, de acordo com a metodologia descrita por Baracat *et al.*, (2004) e Oliveira (2006), com modificações. Inicialmente, foi preparada uma solução contendo polímeros de pectina (Vetec, Brasil) e caseína (Synth, Brasil) (concentração de sólidos totais 8%) como materiais de parede, que foram dispersos em água destilada sob agitação mecânica constante. O pH foi ajustado para 8,0 usando solução de hidróxido de sódio 4,0 M e, em seguida, a mistura foi esterilizada em autoclave a 121°C por 15 min. Após completa dispersão dos polímeros, a suspensão de *E. faecium* CRL 183 (20%, contendo 8,99 log UFC/g) foi adicionada à mistura de polímeros, em condições assépticas, e a redução do pH foi monitorada (pH = 4,8) através de leitura em pHmetro digital. As microcápsulas foram acondicionadas em frascos estéreis.

As microcápsulas obtidas pelos métodos 1 e 2 foram congeladas a -20°C, liofilizadas (Modulyo D Freeze Dryer – Thermo Electron Corporation), e armazenadas em frascos estéreis à temperatura ambiente (25°C±2°C).

Determinação da viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular foi realizada no inóculo e no material já microencapsulado e liofilizado (M1 e M2), acondicionados em temperatura ambiente. As análises foram realizadas imediatamente após o processo de microencapsulação/liofilização e semanalmente durante o período de estocagem ou até que a população de microrganismos fosse reduzida a valores inferiores a 6 log UFC/g.

A viabilidade celular foi determinada por plaqueamento em profundidade, utilizando o meio de cultura M17 (Himedia, Índia) e a incubação realizada em aerobiose, a 37°C/48 h. As colônias foram contadas e os resultados expressos em log UFC/g (ROSSI *et al.*, 2008).

2.2.2 Elaboração da pastilha *diet*

Para a elaboração da pastilha *diet*, foram utilizados os seguintes ingredientes: xilitol (Labonathus, Brasil), água filtrada, gelatina (Gelita, Brasil), inulina GR (Orafti, Brasil), *Enterococcus faecium* CRL 183 microencapsulado e liofilizado pelo método 2 (M2), e aroma de menta sem álcool (Firmenich, Brasil). Todos os ingredientes e aditivos citados estão de acordo com a legislação vigente que dispõe sobre o uso de aditivos alimentares autorizados, segundo as Boas Práticas de Fabricação (ANVISA, 2010).

Com a finalidade de atingir uma granulometria menor (0,177 – 0,125 mm, o correspondente a peneiras de 80-120 mesh) o xilitol, fornecido pela empresa Labonathus, foi submetido a um processo de moagem por 30 min em moinho de esferas no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp, Araraquara.

As pastilhas foram obtidas em três diferentes tratamentos (Tabela 1):

- PC: pastilha controle;
- PPP1: pastilha potencialmente probiótica com adição de *E. faecium* CRL 183;
- PPP2: pastilha potencialmente probiótica com adição de *E. faecium* CRL 183 e inulina (ingrediente prebiótico).

Cada tratamento foi feito em triplicata em lotes de 1 kg.

Tabela 1: Composição dos três tipos de pastilhas produzidos.

Ingredientes	PC (%)	PPP1 (%)	PPP2 (%)
Xilitol	89,60	88,41	85,66
Água	8,40	8,25	8,25
Gelatina	1,50	1,47	1,47
Cultura probiótica	NA	1,38	1,38
Inulina	NA	NA	2,75
Aroma de Menta	0,50	0,49	0,49

Nota: Os valores de porcentagem se referem à composição em massa por massa (m/m).

NA: não adicionado; PC: pastilha probiótica; PPP1: pastilha potencialmente probiótica 1 - *E.faecium* CRL 183; PPP2: pastilha potencialmente probiótica 2 - *E.faecium* CRL 183 + inulina.

Fonte: Dados da Pesquisa

Para reduzir a quantidade de microrganismo microencapsulado/liofilizado adicionado às formulações PPP1 e PPP2 e, conseqüentemente, minimizar possíveis interferências visuais e sensoriais no produto, o inóculo de *E. faecium*, utilizado no processo de microencapsulação, foi previamente concentrado. A cepa probiótica foi propagada em 700 mL de caldo MRS (incubação a 37°C/ 16 h) e o inóculo obtido foi centrifugado por 6000 rpm/15 min. As células concentradas foram então ressuspensas em caldo MRS (40 mL), e o processo de microencapsulação foi realizado de acordo com o procedimento descrito anteriormente.

De acordo com a Portaria nº 29 de 13 de janeiro de 1998, o termo “*diet*” se refere a alimentos direcionados a dietas com restrição de nutrientes (carboidratos, gorduras, proteínas e sódio), e alimentos direcionados para o controle de peso e para dietas de ingestão controlada de açúcares. No caso da categoria de alimentos para dietas com restrição de carboidratos e gorduras, a legislação em questão permite o limite máximo de 0,5g do nutriente para cada 100g do produto final. Já para a categoria de alimentos para dietas com ingestão controlada de açúcares, somente é permitida a presença de açúcares presentes naturalmente nos ingredientes utilizados (ANVISA 1998). A pastilha resultante do presente estudo se enquadra nessa última categoria, tendo em vista que não possui adição de açúcares.

As pastilhas foram preparadas através da aglutinação dos ingredientes (xilitol, aroma de menta, probiótico e prebiótico) pela solução de gelatina, seguida de moldagem (quadrados de 1 x 1 cm) e secagem em estufa com circulação de ar, à 35°C por 20 h (EDWARDS, 2001).

As pastilhas obtidas foram acondicionadas em embalagens plásticas de polietileno de baixa densidade (PEBD), e armazenadas em ambiente com temperatura controlada (câmara BOD - Biochemical oxygen demand, Fanem, Brasil), à 23°C.

2.2.3 Caracterização da pastilha *diet*

Análises microbiológicas

Amostras de 25 g de cada uma das formulações foram coletadas e homogeneizadas com 225 mL de água peptonada. Diluições seriadas foram preparadas e utilizadas para determinação da viabilidade de microrganismo probiótico e da segurança microbiológica do produto final. As análises microbiológicas foram feitas em duplicata.

Determinação da Viabilidade Celular

Para a determinação da viabilidade celular foi realizado plaqueamento em meio de cultura M17 (Himedia, Índia), e a incubação foi realizada em aerobiose, a 37°C/48 h. As colônias foram contadas e os resultados expressos em log UFC/g (ROSSI *et al.*, 2008). A viabilidade do microrganismo probiótico no produto foi acompanhada semanalmente por 28 dias.

Determinação da segurança microbiológica

A segurança microbiológica foi avaliada através da determinação dos seguintes grupos de microrganismos (ANVISA, 2001): coliformes a 45°C/g pelo método Petrifilm para contagem de Coliformes Totais ou Termotolerantes (3M, Estados Unidos), mesófilos totais e bolores e leveduras, utilizando os meios PCA (Plate Count Agar, Himedia, Índia) com incubação a 37°C/48 h e PDA, acidificado com ácido tartárico 10% (Potato Dextrose Agar, Himedia, Índia, pH: 3,5 – 4,0) com incubação a 30°C/ 72 a 120 h , respectivamente.

Análises Físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas a cada 15 dias e em triplicata.

Análise de cor

A determinação de cor foi realizada em colorímetro Hunterlab (Color Quest XE) utilizando iluminante D65 e ângulo visual de 10°. Valores de L*, a* e b* foram determinados como indicadores de luminosidade, índice de cor vermelha e índice de cor amarela, respectivamente.

Análise do teor de umidade

A determinação do teor de umidade das amostras foi realizada através de radiação infravermelha.

Análise de atividade de água

A atividade de água foi determinada por leitura direta em aparelho medidor de atividade de água (AQUALAB CX-2), utilizando 3 g de amostra.

Análise de pH

O pH das amostras foi determinado em pHmetro digital (Qualxtron Model 8010), utilizando 3 g de pastilhas dissolvidas em 20 mL de água destilada. (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

Análise Sensorial

A análise sensorial foi planejada para ser realizada imediatamente após o preparo das pastilhas e a cada 30 dias, até que a viabilidade do microrganismo atingisse valores inferiores a 6 log UFC/g. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara (protocolo de aprovação 661487).

Foi realizado um teste de aceitação, onde foram avaliados os atributos de cor, aroma, textura, sabor e impressão global. As análises foram realizadas no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Alimentos e Nutrição – FCF (UNESP, Araraquara), sendo

utilizada uma escala hedônica estruturada mista de nove pontos (STONE, SIDEL, 1993). A intenção de compra foi investigada através de um teste utilizando escala de atitude de cinco pontos, variando de “certamente compraria” a “certamente não compraria” o produto (MEILGAARD *et al.*, 1988). As amostras foram apresentadas em blocos completos casualizados, codificadas com algarismos de três dígitos e de forma monádica. A equipe foi composta por 112 consumidores não treinados, habituados à ingestão regular de doces semelhantes às pastilhas.

2.2.4 Avaliação do Potencial Anticariogênico da Cepa Probiótica

Capacidade de sobrevivência do *E. faecium* CRL 183 à saliva.

A capacidade de sobrevivência da cepa probiótica à saliva foi avaliada nas pastilhas PPP1 e PPP2 no tempo inicial (logo após o processamento) e nas células livres de *E. faecium* CRL 183. Foi utilizado o método de inoculação direta em saliva proposto por Haukioja (2009), com modificações. A saliva utilizada, obtida através de um doador saudável, foi esterilizada em autoclave a 121°C/15 min. Pastilhas e células livres foram inoculadas em saliva, em concentração de 10% (v/v, ou seja, 1 mL de inóculo em 10 mL de saliva e 1 g de pastilha em 10 mL de saliva), e em seguida os tubos foram incubados a 37°C/24 h. Nos tempos iniciais (T0: antes de incubar) e após 24h de incubação (T24) foram conduzidas análises de viabilidade celular em triplicata, utilizando meio M17 (Himedia, Índia), com incubação à 37°C/48 h, em aerobiose. Os valores foram expressos em log UFC/g.

Potencial de inibição da cepa probiótica *E. faecium* CRL 183

A capacidade de inibição de multiplicação da principal espécie causadora da cárie, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, pela cepa probiótica *E. faecium* CRL 183 foi avaliada através da técnica de difusão em poços (LEWUS; MONTVILLE, 1991). Para a realização desse teste, as células de *S. mutans* (8,26 log UFC/g), utilizado como microrganismo indicador, e de *E. faecium* (8,13 log UFC/g) foram previamente repicadas em caldo BHI e MRS (10% v/v), respectivamente, e, após terem sido incubadas a 37°C/16h, foram centrifugadas a 7.000 rpm/10 min. O sobrenadante foi eliminado e as células foram

ressuspendidas em água peptonada (10% v/v). Em seguida, a placa foi preparada (triplicata) através do depósito de uma camada de meio LAPTg (composição por 100 mL: extrato de levedura 10 g, peptona 15 g, glicose 10 g, tiptona 10 g, Tween 80 1 mL, ágar 1,5 g, sacarose 70 g). Após a completa solidificação, uma sobrecamada de aproximadamente 10 mL de LAPTg blando (0,75 g ágar) contendo 10 µL de *S. mutans* foi acrescentada à placa de petri. Após a completa solidificação, um poço de aproximadamente 5 mm de diâmetro foi feito e, em seguida, depositou-se 30 µL de *E. faecium* CRL 183. As placas foram incubadas a 37°C/24h, em aerobiose. Após esse período, foi realizada a leitura do halo de inibição (cm).

2.2.5 Análise Estatística dos Resultados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de médias de Tukey (dados paramétricos) ou t-student. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa para análise estatística Biostat, sendo adotado o nível mínimo de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação da viabilidade celular

Danos e perdas de atividade celular podem ocorrer tanto durante o processamento quanto durante a estocagem de células desidratadas. Nesse sentido, a escolha da técnica de microencapsulação adequada é importante, pois, deve assegurar a sobrevivência dos microrganismos durante o processamento e estocagem (OLIVEIRA *et al.*, 2007a,b).

Para estabelecer que a viabilidade do microrganismo probiótico fosse acompanhada até atingir valores inferiores a 6 log UFC/g, foram considerados os seguintes pontos: 1) a quantidade de inóculo a ser incorporado às pastilhas deveria ser o mínimo possível para evitar efeitos sensoriais indesejados; 2) o efeito probiótico esperado seria local, ou seja, o microrganismo não estaria exposto ao estresse do ambiente gastrointestinal, e, por isso, uma quantidade inferior à sugerida por pesquisadores internacionais e pela ANVISA (Agência

Nacional de Vigilância Sanitária, 2008) – 8 a 9 log UFC/ porção diária do produto - seria suficiente.

A variação no número de células viáveis do probiótico na forma livre e após a microencapsulação pelos métodos de extrusão e coacervação complexa (M1 e M2, respectivamente) seguidos de liofilização, ao longo do tempo de estocagem, é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2: Viabilidade da cepa *E. faecium* CRL 183 (média $\pm$ DP - log UFC/g) nas formas livres e microencapsulada pelos métodos de extrusão (M1) e coacervação complexa (M2), seguidos de liofilização, ao longo do tempo de estocagem em 25°C $\pm$ 2°C.

Tempo (dias)	M1	M2	Células livres
0	5,74 $\pm$ 0,03 ^{a A}	8,73 $\pm$ 0,06 ^{a B}	8,84 $\pm$ 0,04 ^{a B}
14	3,35 $\pm$ 0,05 ^{b A}	8,59 $\pm$ 0,02 ^{b B}	6,97 $\pm$ 0,05 ^{b C}
28	-	8,65 $\pm$ 0,03 ^{abc A}	5,06 $\pm$ 0,04 ^{c B}
42	-	8,59 $\pm$ 0,06 ^{bcd A}	2,50 $\pm$ 0,07 ^{d B}
56	-	8,13 $\pm$ 0,05 ^e	-
70	-	8,05 $\pm$ 0,03 ^{ef}	-
84	-	8,38 $\pm$ 0,02 ^g	-
98	-	8,49 $\pm$ 0,05 ^{bdgh}	-
112	-	8,39 $\pm$ 0,02 ^{ghi}	-
126	-	8,31 $\pm$ 0,02 ^{gij}	-
140	-	8,31 $\pm$ 0,02 ^{gijk}	-
154	-	8,02 $\pm$ 0,01 ^{efl}	-
168	-	8,30 $\pm$ 0,01 ^{gijkm}	-
182	-	8,03 $\pm$ 0,05 ^{efl}	-
196	-	8,31 $\pm$ 0,02 ^{gijkm}	-
210	-	7,43 $\pm$ 0,03 ⁿ	-
224	-	7,57 $\pm$ 0,06 ^o	-
238	-	7,13 $\pm$ 0,05 ^p	-
252	-	7,16 $\pm$ 0,02 ^p	-
266	-	6,93 $\pm$ 0,01 ^q	-

Nota: Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,01$) – método M2 e células livres.

Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de T-student ($p<0,01$) – método M1.

Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$)

Fonte: Dados da pesquisa

No tempo inicial a média da população da cepa probiótica *E. faecium* CRL 183 na forma de células livres foi de $8,84\pm0,04$ log UFC/g. A viabilidade do microrganismo foi mantida imediatamente após a microencapsulação pela técnica de coacervação complexa (M2) seguida de liofilização ($8,73\pm0,06$ log UFC/g), indicando que as células não foram afetadas pelo processamento ($p<0,05$). Somente após 210 dias de estocagem observou-se redução de 1 ciclo logarítmico na sobrevivência das células probióticas (M2). Os resultados evidenciam ainda que a técnica de coacervação complexa (M2) foi capaz de proteger a cepa *E. faecium* CRL 183 durante aproximadamente 9 meses ou 273 dias, uma vez que a viabilidade do microrganismo probiótico foi reduzida a valores inferiores a 6 log UFC/g apenas no tempo 280 dias. Oliveira (2006) também aplicou a técnica de coacervação complexa em matriz de caseína e pectina, seguida de secagem em *spray dryer*, para microencapsular células de *Lactobacillus acidophilus* e de *Bifidobacterium lactis*. Após 120 dias de estocagem, a contagem de células viáveis de *L. acidophilus* apresentou reduções de 0,71 (redução de 8,28 para 7,57 log UFC/g) e 1,93 (redução de 8,17 para 6,24 log UFC/g) ciclos logarítmicos, a 7°C e a 37°C, respectivamente. Ao contrário das células de *L. acidophilus*, as células de *B. lactis* não mantiveram os valores de viabilidade acima de 6 log UFC/g durante o tempo de estocagem, apresentando queda de 8,60 para 4,26 log UFC/g a 7°C e de 8,60 para 2,64 log UFC/g a 37°C, após 120 dias de estocagem.

A microencapsulação através da técnica de extrusão seguida de liofilização (M1) ocasionou redução de 3,1 ciclos logarítmicos na viabilidade da cepa *E. faecium* CRL 183, em relação ao valor inicial obtido na suspensão de células livres ($8,84\pm0,04$ para $5,74\pm0,03$ log UFC/g), imediatamente após o preparo das cápsulas. Após 14 dias de estocagem à temperatura ambiente o número de células viáveis do microrganismo atingiu $3,35\pm0,05$ log UFC/g, o que representa queda de 5,49 ciclos logarítmicos, em relação ao valor obtido na suspensão de células livres. Tal resultado evidencia que o método de extrusão não é adequado para a microencapsulação da cepa *E. faecium* CRL 183.

O uso de alginato como material de parede resulta em cápsulas porosas, tornando possível a migração do material de enchimento para o meio externo (MANDAL *et al.*, 2014; ROKKA, RANTAMAKI, 2010). Uma possível explicação para os resultados do presente estudo seria a característica de porosidade das cápsulas obtidas que permitiria a passagem das células probióticas para o meio externo.

No estudo de Haghshenas *et al.*, (2015) células isoladas de um tradicional produto lácteo fermentado do Irã e identificadas como *Lactobacillus plantarum* 15 HN foram submetidas à microencapsulação por extrusão utilizando como material de parede alginato e alginato associado a *psyllium* ou alforva em nove diferentes concentrações. Os valores de viabilidade das microcápsulas obtidas das diferentes combinações e concentrações dos materiais de parede citados foram acompanhados e comparados com os valores obtidos em células livres, durante 28 dias de estocagem a 4°C. Enquanto as células livres apresentaram brusca queda de viabilidade (9,6 para 1,81 log UFC/g ao final de 28 dias), as microcápsulas obtidas por combinações em que a concentração de alginato utilizado sozinho ou associado ao *psyllium* ou alforva estava abaixo de 1,5%, apresentaram moderada capacidade de proteção às células, já que reduções na ordem de 3-4 ciclos logarítmicos foram obtidas ao final do tempo de estocagem. Por outro lado, as microcápsulas obtidas pelas combinações de 2% alginato, 1,5% alginato – 0,5% *psyllium*, 1,5% alginato – 0,5% alforva mantiveram 95% de sua viabilidade ao final do tempo de estocagem. O estudo mostrou que a porcentagem de alginato utilizado como material de parede exerce importante papel na proteção das células. O presente estudo utilizou a concentração de alginato sugerida como ideal pelo estudo de Haghshenas *et al.*, (2015), no entanto, o efeito e o comportamento de uma bactéria é cepa-dependente, não sendo possível extrapolar os dados, inclusive para outras cepas da mesma espécie (SHA, 2007).

As células livres tiveram sua viabilidade reduzida a valores inferiores a 6 log UFC/g após 28 dias de armazenamento à temperatura ambiente, evidenciando que o método de microencapsulação por coacervação complexa, associado à liofilização, aumentou a viabilidade do microrganismo em 200 dias.

Considerando os resultados obtidos, apenas a técnica de coacervação complexa associada à liofilização (M2) foi selecionada para a continuação dos estudos, uma vez que

protegeu adequadamente o microrganismo probiótico (*E. faecium* CRL 183), possibilitando a sua incorporação a produtos armazenados à temperatura ambiente.

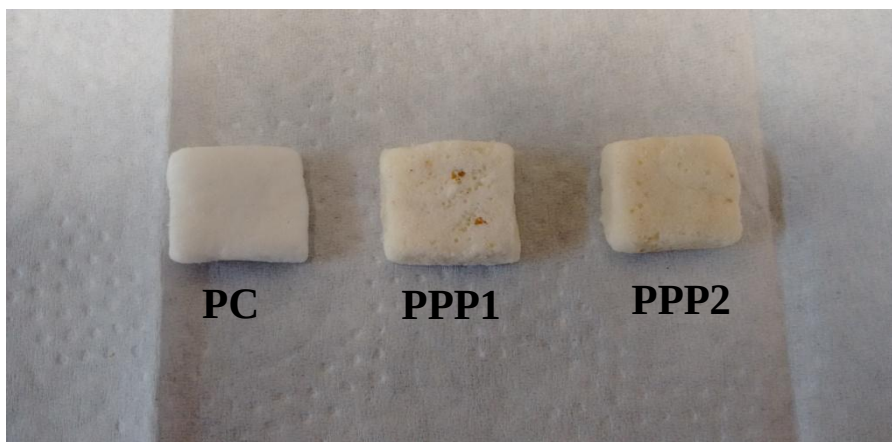
3.2 Elaboração da pastilha *diet*

Após ser concentrado por centrifugação, microencapsulado (M2) e liofilizado, o microrganismo *E. faecium* CRL 183 apresentou população média de células viáveis de $10,62 \pm 0,04$ log UFC/g. O microrganismo foi adicionado às pastilhas potencialmente probióticas, PPP1 e PPP2, em quantidade suficiente para atingir 7,0 log UFC /g de pastilha.

Considerando o peso médio de cada pastilha (1,5g), a ingestão diária de uma unidade não seria suficiente para atingir a quantidade de células viáveis sugerida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (10^8 a 10^9 UFC/g – na porção diária do produto pronto para o consumo), para que os benefícios do probiótico sejam observados (ANVISA, 2008). No entanto, deve-se destacar que o principal alvo do confeito probiótico seria a cavidade oral, ou seja, o efeito pretendido seria o local. Nesse caso, quantidades inferiores às preconizadas pela legislação podem ser aceitas, desde que os efeitos benéficos sejam comprovados (ANVISA, 2008).

A Figura 2 mostra a aparência das pastilhas prontas para o consumo.

Figura 2: Pastilhas diet controle (PC), e potencialmente probióticas (PPP1 e PPP2).



Fonte: Dados da pesquisa. PPP1: pastilha potencialmente probiótica 1 - *E. faecium* CRL 183; PPP2: pastilha potencialmente probiótica 2 - *E. faecium* CRL 183 + inulina.

3.3 Caracterização da pastilha *diet*

3.3.1 Análises microbiológicas

Determinação da viabilidade celular

A viabilidade do microrganismo probiótico *E. faecium* CRL 183, nas pastilhas (PPP1 e PPP2), foi avaliada por um período de 28 dias. A temperatura de estocagem foi mantida a 23°C durante todo o período. Os dados obtidos são apresentados pela Tabela 3.

Tabela 3: Viabilidade da cepa de *E. faecium* CRL 183 (média $\pm$ DP - log UFC/g) adicionado às pastilhas potencialmente probióticas (PPP1 e PPP2) durante o período de estocagem.

Tempo (dias)	PPP1	PPP2
0	5,53 $\pm$ 0,05 ^{a A}	4,83 $\pm$ 0,01 ^{a B}
7	3,35 $\pm$ 0,02 ^{b A}	4,15 $\pm$ 0,01 ^{b B}
14	2,71 $\pm$ 0,07 ^{c A}	4,01 $\pm$ 0,01 ^{c B}
21	2,52 $\pm$ 0,07 ^{d A}	3,30 $\pm$ 0,07 ^{d B}
28	1,86 $\pm$ 0,07 ^{e A}	1,05 $\pm$ 0,08 ^{e B}

Nota: Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de T-Student ($p < 0,05$).

PPP1: pastilha potencialmente probiótica 1 - *E. faecium* CRL 183; PPP2: pastilha potencialmente probiótica 2 - *E. faecium* CRL 183 + inulina.

Fonte: Dados da pesquisa

A população da cepa probiótica foi reduzida imediatamente após a produção das pastilhas, alcançando valores inferiores a 6,0 log UFC/g em ambas as formulações PPP1 (5,53 $\pm$ 0,05 log UFC/g) e PPP2 (4,83 $\pm$ 0,01 log UFC/g). Após 7 dias de estocagem a viabilidade do microrganismo na formulação PPP1 apresentou redução superior a 2 ciclos logarítmicos, enquanto na formulação PPP2 observou-se queda de 1,5 ciclo logarítmico após 21 dias, fato esse que indicaria um possível efeito protetor da inulina. No entanto, esse efeito não foi mantido no período subsequente de análise. Ao final de 28 dias, a população de células viáveis foi drasticamente reduzida nas formulações PPP1 (1,86 $\pm$ 0,07

log UFC/g) e PPP2 (1,05±0,08 log UFC/g) e, por esse motivo, o acompanhamento da viabilidade durante o período de estocagem foi finalizado.

Essa redução na viabilidade não era esperada, uma vez que o microrganismo microencapsulado se manteve viável à temperatura ambiente, por um período superior a nove meses. Entre as possíveis causas relacionadas à redução na população de microrganismos probióticos, durante e após o processamento de alimentos, estão: temperatura de processamento, incorporação de oxigênio, estresse mecânico e origem das matérias-primas e ingredientes (SHAH, 2000). As etapas de obtenção da pastilha não envolvem temperaturas elevadas ou procedimentos que levem a incorporação de oxigênio ou estresse mecânico. Dessa forma, em um primeiro momento, a maior probabilidade de envolvimento nas alterações recaiu sobre os ingredientes utilizados.

A princípio, suspeitou-se que o aroma utilizado poderia estar ocasionando tais reduções na viabilidade do microrganismo probiótico, já que muitos aromas possuem álcool e derivados em sua composição. No entanto, o produto foi processado sem a adição de aroma e o comportamento do microrganismo probiótico nas formulações PPP1 e PPP2 foi semelhante (Tabela 4) ao com adição de aroma.

Tabela 4: Viabilidade da cepa de *E. faecium* CRL 183 (média ± DP - log UFC/g) adicionado às pastilhas potencialmente probióticas (PPP1 e PPP2), produzidas sem aroma, durante 28 dias de estocagem.

Tempo (dias)	PPP1	PPP2
0	6,28±0,01 ^{a A}	6,26±0,01 ^{a A}
7	4,56±0,02 ^{b A}	4,42±0,05 ^{b A}
14	4,44±0,04 ^{c A}	4,18±0,03 ^{c A}
21	2,10±0,04 ^{d A}	2,41±0,05 ^{d B}
28	1,73±0,05 ^{e A}	1,26±0,07 ^{e A}

Nota: Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de T-Student (p<0,05).

PPP1 pastilha potencialmente probiótica 1 - *E. faecium* CRL 183; PPP2: pastilha potencialmente probiótica 2 - *E. faecium* CRL 183 + inulina. Fonte: Dados da pesquisa

Os dados apresentados na Tabela 4 evidenciam que os valores de viabilidade obtidos para ambas as formulações, PPP1 e PPP2, ao longo do tempo de estocagem, foram semelhantes entre si. Esse comportamento fornece indícios de que a presença do aroma pode interferir na viabilidade do microrganismo probiótico e que a inulina pode exercer um efeito protetor na presença de aroma, entretanto essa proteção não é suficiente para manter o número de células viáveis elevado durante o período de armazenamento.

O xilitol, poliól que foi utilizado para substituir o açúcar nas pastilhas, é o ingrediente majoritário nas três formulações. Os polióis são muito utilizados na indústria de confeitaria isentos de açúcar, e são obtidos pela conversão do grupo carbonílico dos açúcares em álcool, por hidrogenação catalítica (SILVA *et al.*, 1994). Estudos mostram que dissacarídeos e polióis podem atuar como protetores das células durante o processo de secagem e posterior estocagem (CARVALHO *et al.*, 2004). Não foram encontrados estudos que relacionem o uso de polióis à queda de viabilidade de microrganismos probióticos.

Outro fator relevante que pode estar relacionado com a brusca queda de viabilidade das pastilhas é o tipo de embalagem utilizada para o acondicionamento das mesmas. O polietileno (PE) possui excelente barreira ao vapor d'água, no entanto, é permeável a gases (JORGE, 2013). A migração de gás oxigênio do ambiente externo para o interior da embalagem pode ter ocasionado perda de viabilidade do *E. fecium* nas pastilhas probióticas. Essa interação do gás oxigênio com a cepa probiótica pode ter sido minimizada durante a estocagem das microcápsulas de *E. faecium*, tendo em vista que o material utilizado para o acondicionamento foram frascos de vidro. O vidro é um material que possui excelentes propriedades de barreira, sendo impermeável a vapores e gases (JORGE, 2013).

Os resultados do presente trabalho foram discordantes dos obtidos por outros pesquisadores, com diferentes microrganismos probióticos, ressaltando que devemos sempre considerar o comportamento cepa específico dos microrganismos estudados. A literatura apresenta estudos em que pastilhas (formulação em que um ou dois hidrocolóides possuem a função de aglutinar os ingredientes pós) ou tabletes (formulação onde todos os ingredientes são pós com propriedade de coesão e quando submetidos a uma compressão são compactados) foram utilizados como veículos para administração de probióticos. Nesses

estudos o enfoque é dado aos efeitos locais e sistêmicos conferidos pelos microrganismos, e poucas informações referentes à sobrevivência dos mesmos no produto ao longo do tempo de estocagem são fornecidas. Toiviainen *et al.* (2015) utilizaram pastilhas de xilitol e sorbitol para veicular *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium lactis* fornecidas a adultos jovens e saudáveis, com o objetivo de estudar o efeito na microbiota oral. A viabilidade de ambas as cepas na pastilha desenvolvida por esse grupo de pesquisa, se manteve na ordem de 8 log UFC/g durante as 4 semanas de estudo. Já o estudo de Çaglar *et al.* (2008) avaliou o efeito inibidor de pastilhas de isolmalte contendo cepas de *Lactobacillus reuteri* frente ao *Streptococcus mutans*, em mulheres jovens. Segundo os autores, durante os dez dias de administração das pastilhas, a viabilidade do microrganismo probiótico no produto se manteve na ordem de 8 log UFC/g.

Determinação da segurança microbiológica

As análises para a determinação de mesófilos totais, bolores e leveduras e coliformes termotolerante, foram realizadas nos tempos iniciais (T=0), após 14 dias e 28 dias de armazenamento (Tabela 5).

Tabela 5: Resultados (médias $\pm$ DP) das análises microbiológicas das diferentes formulações de pastilhas.

Grupo de microrganismos	Formulações		
	PC	PPP1	PPP2
T=0 dias			
Mesófilos totais (log UFC/g)	aus.	5,47 $\pm$ 0,04 ^A	4,84 $\pm$ 0,01 ^B
Bolores e Leveduras (log UFC/g)	aus.	2,21 $\pm$ 0,03 ^A	1,80 $\pm$ 0,03 ^B
Coliformes Totais e Termotolerantes	aus.	aus.	aus.
T=14 dias			
Mesófilos totais (log UFC/g)	aus.	2,67 $\pm$ 0,02 ^A	4,00 $\pm$ 0,01 ^B
Bolores e Leveduras (log UFC/g)	aus.	2,79 $\pm$ 0,01 ^A	2,79 $\pm$ 0,01 ^A
Coliformes Totais e Termotolerantes	aus.	aus.	aus.
T=28 dias			
Mesófilos totais (log UFC/g)	1,10 $\pm$ 0,04 ^A	2,03 $\pm$ 0,04 ^B	1,02 $\pm$ 0,05 ^A
Bolores e Leveduras (log UFC/g)	1,04 $\pm$ 0,06 ^A	4,38 $\pm$ 0,03 ^B	4,09 $\pm$ 0,08 ^B
Coliformes Totais e Termotolerantes	aus.	aus.	aus.

Nota: aus. = ausente.

Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de T-Student ($p < 0,05$).

PC= pastilha controle; PPP1: pastilha potencialmente probiótica 1 - *E. faecium* CRL 183; PPP2: pastilha potencialmente probiótica 2 - *E. faecium* CRL 183 + inulina.

Fonte: Dados da pesquisa

Segundo o regulamento técnico que estabelece os padrões microbiológicos para alimentos, a categoria onde se enquadram as pastilhas, exige apenas análise de coliformes a 45°C/g. A legislação em questão exige que os valores encontrados estejam abaixo de 10 UFC/g (ANVISA, 2001). No presente estudo, as análises de mesófilos totais e bolores e leveduras também foram conduzidas com intuito de atingir maior robustez na segurança microbiológica. Os resultados mostraram que as três formulações atenderam o parâmetro recomendado para coliformes a 45°C/g, durante todo o tempo de estocagem à temperatura de 23°C. Já os valores encontrados para bolores e leveduras se mantiveram baixos até 14 dias de estocagem, no entanto, após 28 dias a população atingiu valores superiores a 4 log UFC/g,

com o surgimento de colônias visíveis macroscopicamente no produto e, por esse motivo, os testes sensoriais foram interrompidos. A cepa probiótica utilizada no presente estudo é mesófila e encontra condições ideais para se multiplicar em meio PCA – plate count agar (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Por esse motivo, a população de microrganismos mesófilos é semelhante aos valores de viabilidade encontrados nas formulações PPP1 e PPP2. O número de células viáveis do microrganismo probiótico foi reduzido durante o tempo de estocagem (Tabelas 3 e 4), explicando a redução observada na população de microrganismos mesófilos nas formulações PPP1 e PPP2.

3.3.2 Análises físico-químicas

Os resultados das análises físico-químicas ao longo do tempo de estocagem (média das análises quinzenais) são apresentados na Tabela 6.

Os parâmetros atividade de água, umidade e pH não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as formulações PC, PPP1 e PPP2. O uso de sacos de polietileno para acondicionar as pastilhas pode ter contribuído para a constância nos resultados de atividade de água e umidade ao longo dos 28 dias, tendo em vista que o material possui excelente barreira a vapor d'água (JORGE, 2013). Já o parâmetro cor apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre as formulações PC, PPP1 e PPP2, confirmando que a adição do microrganismo probiótico alterou a cor do produto.

A faixa de atividade de água sugerida para categoria de confeitos direcionada às pastilhas é de 0,40 a 0,75 (BUSSIERE, SERPELLONI, 1985). De acordo com informações apresentadas pela literatura, valores de atividade de água em torno de 0,80, estão na faixa onde há susceptibilidade para o desenvolvimento de fungos e leveduras. Para minimizar os riscos de desenvolvimento microbiano, valores de atividade de água menor ou igual a 0,60 são recomendados, já que abaixo do referido valor os componentes presentes no alimento que poderiam servir de substrato a tais microrganismos, se encontram concentrados inibindo a multiplicação dos mesmos (BOBBIO, BOBBIO, 2001).

Com relação à cor, o tratamento controle exibiu maiores médias para o parâmetro L* (luminosidade) e menores médias para os parâmetros a* (cor vermelha) e b* (cor amarela)

($p < 0,05$). Tais resultados podem ser explicados pelo fato da adição do probiótico e da substância prebiótica alterarem a coloração das pastilhas, tornando-as mais escuras (Figura 2).

Tabela 6: Resultados (médias $\pm$ DP) obtidos através das análises de atividade de água, umidade, pH e cor para as 3 formulações estudadas nos 28 dias de estocagem.

Análise	PC	PPP1	PPP2
Atividade de água	0,79 $\pm$ 0,01 ^A	0,77 $\pm$ 0,02 ^A	0,75 $\pm$ 0,02 ^A
Umidade (%)	2,31 $\pm$ 0,07 ^A	2,12 $\pm$ 0,07 ^A	1,99 $\pm$ 0,06 ^A
pH	6,28 $\pm$ 0,08 ^A	6,25 $\pm$ 0,05 ^A	6,23 $\pm$ 0,07 ^A
Cor	L* 92,77 $\pm$ 0,90 ^A	L* 85,84 $\pm$ 0,92 ^B	L* 88,64 $\pm$ 0,78 ^C
	a* -0,20 $\pm$ 0,07 ^A	a* 0,38 $\pm$ 0,09 ^B	a* 0,51 $\pm$ 0,09 ^C
	b* 1,30 $\pm$ 0,08 ^A	b* 7,00 $\pm$ 0,29 ^B	b* 8,13 $\pm$ 0,39 ^C

Nota: Médias com letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

PC= pastilha controle; PPP1: pastilha potencialmente probiótica 1 - *E. faecium* CRL 183; PPP2: pastilha potencialmente probiótica 2 - *E. faecium* CRL 183 + inulina.

L* = luminosidade, de preto a branco; a* = de verde a vermelho ; b* = de azul a amarelo

Fonte: Dados da pesquisa

3.3.3 Análise Sensorial

As análises sensoriais foram planejadas para serem realizadas no tempo inicial e a cada 30 dias durante o período de estocagem. No entanto, em função do aumento na população de bolores e leveduras e da queda brusca de viabilidade, os testes foram realizados apenas no tempo inicial.

Todas as formulações obtiveram notas acima de 6, ou seja, entre “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente” na escala utilizada, com exceção dos atributos aparência e cor da formulação PPP2 (Tabela 7).

Tabela 7: Resultados (médias $\pm$ DP) do teste de aceitação das formulações PC, PPP1 e PPP2, no tempo inicial (t = 0).

Atributo	PC	PPP1	PPP2
Aparência	7,26 $\pm$ 1,43 ^A	6,11 $\pm$ 1,53 ^B	5,75 $\pm$ 1,51 ^B
Cor	7,59 $\pm$ 1,2 ^A	6,13 $\pm$ 1,49 ^B	5,68 $\pm$ 1,48 ^B
Aroma	6,40 $\pm$ 1,25 ^A	6,32 $\pm$ 1,42 ^A	6,47 $\pm$ 1,56 ^A
Sabor	6,18 $\pm$ 1,71 ^A	6,43 $\pm$ 1,67 ^A	6,97 $\pm$ 1,40 ^B
Textura	6,09 $\pm$ 1,79 ^A	6,23 $\pm$ 1,63 ^A	6,61 $\pm$ 1,44 ^A
Impressão Global	6,58 $\pm$ 1,49 ^A	6,21 $\pm$ 1,39 ^A	6,58 $\pm$ 1,21 ^A

Nota: Médias com letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). n=112 consumidores.

PC= pastilha controle; PPP1 pastilha potencialmente probiótica 1 - *E. faecium* CRL 183; PPP2: pastilha potencialmente probiótica 2 - *E. faecium* CRL 183 + inulina.

Fonte: Dados da pesquisa

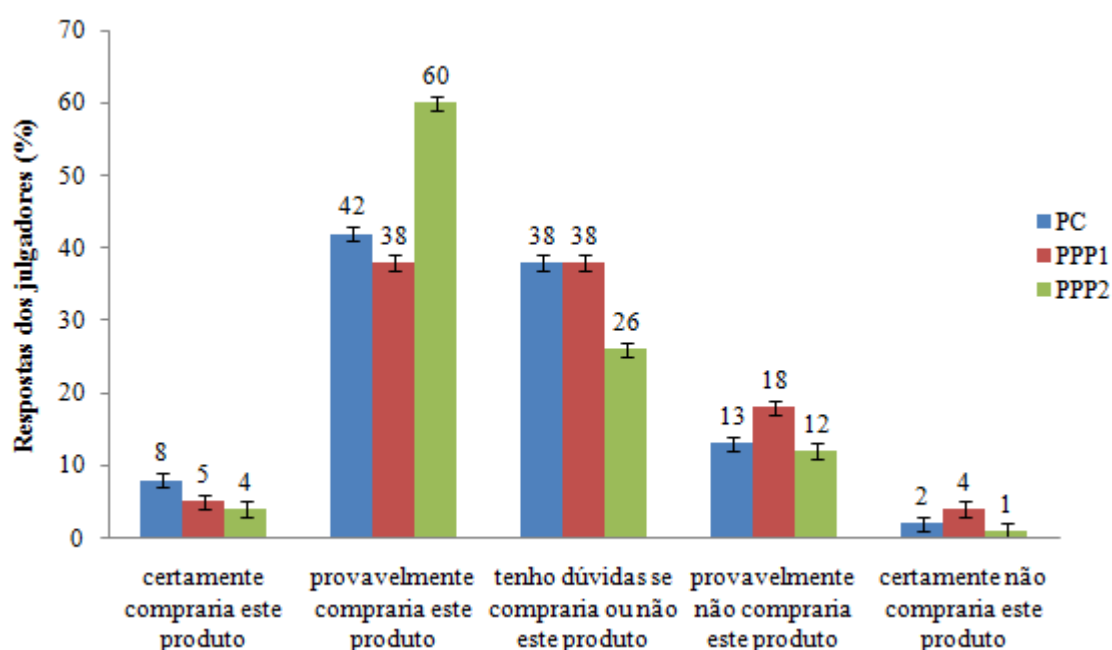
As pastilhas PPP1 e PPP2, comparadas com PC apresentaram médias inferiores para os atributos aparência e cor ($p < 0,05$). Esse resultado pode ser explicado pelo fato da cepa probiótica liofilizada e microencapsulada conferir ao produto uma coloração mais escura, sendo percebida pelos consumidores como um defeito. Por outro lado, os atributos aroma, textura e impressão global não diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$). A adição do microrganismo probiótico associado à inulina melhorou a percepção de sabor, indicando que as alterações de aparência e cor identificadas pelos consumidores não influenciaram negativamente a percepção desse atributo.

Não há estudos na literatura relatando o efeito da adição de probióticos nas características sensoriais de produtos classificados como confeitos tipo pastilhas ou semelhantes. No entanto, em outras categorias de produtos alimentícios, estudos recentes relatam resultados satisfatórios com a adição de microrganismos probióticos microencapsulados ou não. Lalicic-Petronijevic *et al.*, (2015) adicionaram cepas probióticas livres a chocolates ao leite e amargo e não observaram diferenças significativas nas características sensoriais avaliadas ao longo da vida-de-prateleira dos produtos. Nesse estudo, os atributos sabor, odor e textura foram analisados de forma detalhada pelos assessores nos

três tempos pré-determinados ($t = 0$, $t = 90$ dias e $t = 180$). A escala de pontuação oferecida aos assessores variou de 2,5 a 5, onde notas menores que 2,5 representavam produto inaceitável, 2,5-3,5 produto de boa qualidade, 3,5-4,5 produto de muito boa qualidade, e 4,5-5,0 produto excelente. As amostras avaliadas tiveram praticamente todos os seus atributos classificados entre produtos de muito boa qualidade e excelente, nos três tempos.

Os resultados referentes ao teste de intenção de compra encontram-se relacionados na Figura 3.

Figura 3: Médias dos resultados de intenção de compra das formulações no tempo inicial ($t = 0$).



Nota: PC= pastilha controle; PPP1 pastilha potencialmente probiótica 1 - *E. faecium* CRL 183; PPP2: pastilha potencialmente probiótica 2 - *E. faecium* CRL 183 + inulina.

Fonte: dados da pesquisa

A avaliação da intenção de compra evidenciou que 50%, 43% e 64% dos consumidores afirmaram que “certamente” ou “provavelmente comprariam” as pastilhas PC, PPP1 e PPP2, respectivamente. A pastilha com adição da cepa probiótica e da substância prebiótica (PPP2) também apresentou a menor manifestação negativa quanto à intenção de compra (13% certamente ou provavelmente não comprariam o produto). Tais resultados

confirmam os obtidos no teste de aceitação utilizando escala hedônica, onde a formulação 2 (PPP2) se destacou pelo melhor sabor. Outro fato a ser observado é que a formulação controle apresentou somente 50% de intenção positiva de compra, indicando necessidade de aperfeiçoamento da formulação e do método de obtenção dos confeitos.

3.4 Avaliação do potencial anticariogênico da cepa probiótica

Os resultados referentes ao teste de capacidade de sobrevivência da cepa probiótica na saliva, nos tempos iniciais ($t=0$) do inóculo e das pastilhas probióticas, encontram-se expressos na Tabela 8.

Tabela 8: Viabilidade (médias $\pm$ DP) da cepa probiótica inoculada em saliva.

Tratamentos	$t = 0$ (antes de incubar)	$t = 24\text{h}$ de incubação
PPP1	$5,45 \pm 0,03$ ^{a A}	$9,09 \pm 0,02$ ^{a B}
PPP2	$5,66 \pm 0,06$ ^{b A}	$8,97 \pm 0,03$ ^{b B}
Células livres	$8,04 \pm 0,06$ ^{c A}	$8,86 \pm 0,03$ ^{c B}

Nota: Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de T-Student ($p < 0,05$).

PPP1: pastilha potencialmente probiótica 1 - *E. faecium* CRL 183; PPP2: pastilha potencialmente probiótica 2 - *E. faecium* CRL 183 + inulina.

Fonte: Dados da pesquisa

A cepa probiótica manteve-se viável e conseguiu se multiplicar na saliva nas três formas analisadas: pastilhas potencialmente probióticas formulações PPP1 e PPP2 e na forma de células livres. Na forma livre, o número de células viáveis da cepa probiótica aumentou 0,82 ciclo logarítmico após 24 horas, enquanto que nas pastilhas PPP1 e PPP2 o aumento foi mais pronunciado, 3,64 e 3,31 ciclos logarítmicos, respectivamente. Haukioja (2009) avaliou a sobrevivência de 20 cepas probióticas dos gêneros *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. na saliva. Todas as cepas sobreviveram, sendo que nenhuma cepa apresentou aumento na

população após 24 horas e duas delas tiveram a sua viabilidade reduzida no final do tempo de incubação.

Não há estudos na literatura que indiquem que a presença de xilitol pode estimular a multiplicação de microrganismos probióticos. No entanto, sabe-se que o xilitol pode afetar a microbiota oral através da redução da taxa de multiplicação e produção de ácido pelas células, levando à redução de *S. mutans* e cáries em usuários habituais de produtos contendo o referido póliol (MARSH; MARTIN, 2005). Çaglar *et al.* (2007) utilizaram gomas de mascar para veicular xilitol e probióticos do gênero *Lactobacillus* spp. (8 log UFC/g) para estudar o efeito dessa combinação sobre a contagem de células de *S. mutans* presentes na saliva. A redução no número de células viáveis de *S. mutans* foi verificada tanto através da veiculação dos microrganismos probióticos como do xilitol, no entanto, a combinação de ambos não potencializou o efeito observado. Mais uma vez, se faz importante ressaltar que todo efeito é cepa dependente e não deve ser extrapolado nem mesmo para outras cepas da mesma espécie (SHA, 2007).

No teste que analisou o potencial de inibição da cepa probiótica *E. faecium* CRL 183 frente à cepa causadora de cárie dental (*Streptococcus mutans* ATCC 25175), observou-se a formação de halo de inibição de $1,7 \pm 0,3$ cm de diâmetro (Figura 4). Esse resultado evidencia que a cepa probiótica foi capaz de inibir a multiplicação de *S. mutans*, nas condições de estudo, e apresenta potencial para auxiliar na redução do risco de cárie dental. Redondo (2008) verificou através da técnica *spot on the lawn* que as cepas *E. faecium* CRL183 e *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 não apresentaram nenhum efeito inibitório frente às cepas patogênicas *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes* V2 e *Salmonella Enteritidis*. Já no estudo do Hassanzadazar *et al.*, (2014), a técnica de difusão em poços comprovou o efeito inibitório da cepa *E. faecium* isolada de queijo tipicamente iraniano, frente a uma cepa patogênica de *Listeria monocytogenes*.

Figura 4: Placas representativas dos resultados obtidos no teste de difusão em poços, com presença de halo de inibição. Cepa indicadora (inoculada no meio de cultura): *Streptococcus mutans* ATCC 25175; Cepa probiótica (inoculada nos poços): *Enterococcus faecium* CRL 183



4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que a técnica de coacervação complexa foi eficiente em manter a viabilidade da cepa de *Enterococcus faecium* CRL 183 à temperatura ambiente.

A proposta de confeito probiótico *diet* é interessante, e constitui uma alternativa à diversificação do segmento de produtos probióticos, com potencial anticariogênico agregado. No entanto, a queda brusca da viabilidade da cepa probiótica durante o armazenamento das pastilhas das formulações PPP1 e PPP2, indica a necessidade de aprimoramento do processo de obtenção das mesmas.

A relação entre matriz alimentícia, tipo de material utilizado na embalagem do produto e manutenção da viabilidade celular da cepa probiótica deve ser melhor investigada, a fim de se obter uma definição a respeito da embalagem mais adequada à preservação do produto probiótico em questão.

A cepa probiótica estudada foi capaz de sobreviver e de se multiplicar em saliva humana e inibir a multiplicação da cepa *Streptococcus mutans* ATCC 25175, nas condições do estudo.

Para futuros estudos, sugere-se avaliar a viabilidade do *E.faecium* CRL183 frente a cada um dos ingredientes utilizados na formulação da pastilha e a utilização de embalagens impermeáveis a gases, na tentativa de identificar o agente responsável pela redução da população de microrganismos probióticos no produto. O potencial efeito anticariogênico também deve ser melhor investigado, utilizando testes mais específicos, como por exemplo testes relacionados à formação de biofilme.

5 BIBLIOGRAFIA

ANVISA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos.** Jul. 2008. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov>>. Acesso em: 28 mar. 2015.

ANVISA. **Regulamento técnico referente a Alimentos para Fins Especiais.** 13 jan. 1998. Disponível em <<http://www.anvisa.gov>>. Acesso em: 23 abr. 2016

ANVISA. **Regulamento técnico sobre aditivos alimentares autorizados para uso segundo as boas práticas de fabricação (BPF).** 03 nov. 2010. Disponível em <<http://www.anvisa.gov>>. Acesso em: 25 mar. 2015

ANVISA. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.** 02 jan. 2001. Disponível em <<http://www.anvisa.gov>>. Acesso em: 25 mar. 2015

ARVANITOYANNIS, I. S.; HOUWELINGENKOUKALIAROGLOU, M. V. Functional foods: a survey of health, claims pros and cons, and current legislation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, p. 385-404, 2005.

BARACAT, M. M.; NAKAGAWA, A. M.; FREITAS, L. A. P.; DE FREITAS, O. Microcapsule processing in a spouted bed. **Canadian Journal Chemistry Engineering**, v. 82, p. 134-141, 2004.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos.** São Paulo: Editora Varela, 3 ed., 2001.

BUSSIÈRE, G.; SERPELLONI, M. Confectionery and water activity determination of aw by calculation. In: SIMATO, D.; MULTON, J. L. **Properties of Water in Foods in Relation to**

Quality and Stability. Dordrecht, The Netherlands: Ed. Martinus Nijhoff Publishers, pp. 627–645, 1985.

ÇAGLAR, E.; KAVALOGLU, S. C.; KUSCU, O. O.; SANDALLI, N.; HOLGERSON, P. L.; TWETMAN, S. H. A. 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.; SANDALI, 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.

CARVALHO, A. S.; SILVA, J.; HO, P.; TEIXEIRA, P.; MLACTA, F. X.; GIBBS, P. Relevant facts for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v 14, p.835-847, 2004.

CAVALLINI, D. C. U.; ABDALLA, D. S. P.; VENDRAMINI, R. C.; BEDANI, R.; BONDESPACHO, L. Q.; PAULY-SILVEIRA, N. D.; VALDEZ, G. F.; ROSSI, E. A. Effects of isoflavone-supplemented soy yogurt on lipid parameters and atherosclerosis development in hypercholesterolemic rabbits: a randomized double-blind study. **Lipids in Health and Disease**, v.8, p.1-10, 2009b.

CAVALLINI, D. C. U.; BEDANI, R.; PAULY, N. D.; BONDESPACHO, L. Q.; VENDRAMINI, R. C.; ROSSI, E. A. Effects of probiotic bacteria, isoflavones and simvastatin on lipid profile and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Lipids in Health and Disease**, v.8, p.1, 2009a.

CAVALLINI, D. C. U; CELIBERTO, L. S.; ROSELINO, M. N.; BEDANI, R.; PAULY-SILVEIRA, N. D.; VALDEZ, G. F.; PINTO, R. A.; ROSSI, E. A. **Effect of a probiotic fermented soy product on colonic inflammation in dextran sodium sulfate-induced colitis in rats.** 7 th Probiotics & Prebiotics new foods, Rome, 2013.

CELIBERTO, L. S. **Efeito de uma bebida probiótica (*Enterococcus faecium* CRL 183 e *Bifidobacterium longum* ATCC 15707) à base de extrato aquoso de soja no desenvolvimento de colite quimicamente induzida em ratos.** 105f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2014.

CELIBERTO, L. S.; ROSELINO, M. N.; BEDANI, R.; ROSSI, E. A.; PINTO, R. A.; PAULY-SILVEIRA, N. D.; VALDEZ, G. F; CAVALLINI, D. C. U. **Effect of a probiotic soy beverage and sulfasalazine on fecal microbiota of animals with colitis induced by dextran- sodium sulfate.** 7 th Probiotics & Prebiotics new foods, Rome, 2013.

EDWARDS, W. P. Introduction. In: EDWARDS, W.P **The science of sugar confectionery.** Cambridge: The Royal Society of Chemistry, p.2-3, 2001.

ERKKILÄ, S.; PETÄJÄ, E.; EEROLA, S.; LILLEBERG, L.; MATTILA-SANDHOLM, T.; SUINKO, M. L. Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter culture. **Meat Science**, v.58, p.111-116, 2001.

FAO/WHO. Joint of FAO/WHO Working Group. **Report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food.** London, Ontario, Canada, 30 de abril e 1º maio, 2002.

FÁVARO-TRINDADE, C.S. Microencapsulação de probióticos. In: SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. (Org.). **Probióticos e Prebióticos em Alimentos**. São Paulo: Ed. Varela, p. 239-254, 2011.

FOLIGNÉ, B.; DANIEL, C.; POT, B. Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. **Current Opinion in Microbiology**, v.16, p.284-292, 2013.

GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; NAZZARO, F.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, p.292–302, 2010.

HAGHSHENAS, B.; ABDULLAH, N.; NAMI, Y.; RADIAH, D.; ROSLI, R.; YARI KHOSROUSHAHI, A. Microencapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* 15HN using alginate-psyllium-fenugreek polymeric blends. **Journal of Applied Microbiology**, v.118, p.1048–1057, 2015.

HASSANZADAZAR, H.; EHSANI, A.; MARDANI, K.; HESARI, J. Antibacterial activity of *Enterococcus faecium* derived from Koopeh cheese against *Listeria monocytogenes* in probiotic ultra-filtrated cheese. **Veterinary Research Forum : an International Quarterly Journal**, v. 3, p. 169-175, 2014.

HAUKIOJA, A. **Probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria in the Mouth – in vitro Studies on Saliva-mediated Functions and Acid Production**. 76 f. Tese. Institute of Dentistry, Department of Cariology and Postgraduate School of Oral Health Sciences (PeGaSOS), University of Turku, Finland, 2009

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

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.11, p.506–514, 2014.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. Ed. Adolfo Lutz, 4ª ed., São Paulo, 2005.

JORGE, N. **Embalagens para alimentos**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 1 ed., 2013.

KALE-PRADHAN, P. B.; JASSAL, H. K.; WILHELM, S. M. Role of *Lactobacillus* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a meta analysis. **Pharmacotherapy**, v.30, p.119-126, 2010.

KINOUCI, F. L. “**logurte**” de soja como coadjuvante no tratamento de câncer de mama. 85 f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

LALICIC-PETRONIJEVIC, J.; POPOV-RALJIC, J.; OBRADOVIC, D.; RADULOVIC, Z.; PAUNOVIC, D.; PETRUSIC, M.; PEZO, L. Viability of probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* NCFM® and *Bifidobacterium lactis* HN019 and their impact on sensory and rheological properties of milk and dark chocolates during storage for 180 days. **Journal of Functional Foods**, v.15, p.541-550, 2015.

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

LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**. v.13, p.145-150, 1991.

MANDAL, S.; HATI, S.; PUNIYA, A. K.; KHAMRUI, K.; SINGH, K. Enhancement of survival of alginate-encapsulated *Lactobacillus casei* NCDC 298. **Journal of Science, Food and Agriculture**, v.94, p.1994-2001, 2014.

MARSH, P.; MARTIN, M. **Microbiologia Oral**. 4rd. Ed Santos, 2005.

MEILGARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B. T. **Sensory evolution techniques**. CRC Press, Florida 1988.

OLIVEIRA, A. C. **Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* microencapsulados por coacervação, seguida por secagem por spray drying e leite de jorro**. 77 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), 2006.

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

OLIVEIRA, A. C.; MORETTI, T. S.; BOSCHINI, C.; BALIEIRO, J. C. C.; FREITAS, O.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L.*

acidophillus (LAC 4) by complex coacervation followed by spouted-bed drying. **Dry Technology**, v.25, p.1687-1693, 2007b.

OLIVEIRA, R. S.; CRUZ, R. M. S.; VIEIRA, M. C.; SILVA, C. L. M.; GASPAR, M. N. *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* behavior in frozen water cress (*Nasturtium officinale*) submitted to temperature abuses. **International Journal of Refrigeration**, v. 32, p. 472-477, 2009.

POSSEMIERS, S.; MARZORATI, M.; VERSTRAETE, W.; VAN DE WIELE, T. Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p. 97–103, 2010.

REDONDO, N. C. **Avaliação in vitro de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL 183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416**. 109 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP), 2008.

RIVIERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-diary probiotic products. **Food Microbiology**, v.27, p.1-11, 2010.

ROBERFROID, M. B. Inulin-type fructans: functional food ingredients. **Journal of Nutrition**, v.137, p.2493S-2502S, 2007.

ROKKA, S.; RANTAMAKI, 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.; CARLOS, I. Z.; VENDRAMINI, R. C.; DÂMASO, A. R.; VALDEZ, G. F. Intake of isoflavone-supplemented soy yogurt fermented with

Enterococcus faecium lowers serum total cholesterol and non-HDL cholesterol of hypercholesterolemic rats. **European Food Research and Technology**, v.228, p.275-282, 2008.

ROSSI, E. A.; VENDRAMINI, C. R.; CARLOS, I. Z.; OLIVEIRA, M. G.; VALDEZ, G. F. Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre lípides séricos de homens adultos normocolesterolêmicos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 53, p.47-51, 2003.

ROSSI, E. A.; VENDRAMINI, R. C.; CARLOS, I. Z.; UEIJI, I. S.; SQUINZARI, M. M.; SILVA JÚNIOR, S. I.; VALDEZ, G. F. Effects of a Novel Fermented Soy Product on the Serum Lipids of Hypercholesterolemic Rabbits. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.74, p.213-216, 2000.

SAAVEDRA, J.M. Clinical application of probiotic agents. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 1147S-1151S, 2001

SAAVEDRA, L.; TARANTO, M. P.; SESMA, F.; VALDEZ, G. F. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p.241-245, 2003.

SHA, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v.17, p.1262-1277, 2007.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal Dairy Science**, v.83, p.894-907, 2000.

SILVA, S. S.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A. Xilitol: Um adoçante alternativo para a indústria de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 5, p. 109-117, 1994.

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 Reasearch Technology**, v.228, p.231-237, 2008.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**.2nd ed. London: Academic, 1993. 338p.

TOIVIAINEN, A.; JALASVUORI, H.; LAHTI, E.; GURSOY, U.; SALMINEN, S.; FONTANA, M.; FLANNAGAN, S.; ECKERT, G.; KOHARAS, A.; PASTER, B.; SODERLING, E. Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. Lactis BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and th oral microbiome in healthy adults. **Clinical Oral Investigation**, v. 19, p77-83, 2015.