



VIII-Okttoberforum – PPGEQ

20, 21, 22 e 23 de outubro de 2009

VIABILIDADE DE *Lactobacillus plantarum* IMOBILIZADOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES EM MEIOS GASTROINTESTINAIS SIMULADOS E SOB CONDIÇÕES DE REFRIGERAÇÃO

Graziela Brusch Brinques¹, Marco Antônio Záchia Ayub¹

¹ Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (BIOTECLAB-ICTA)
Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
R. Eng. Luis Englert, s/n. Campus Central. CEP: 90040-040 - Porto Alegre - RS - BRASIL,
E-MAIL: grazibb@enq.ufrgs.br, mazayub@ufrgs.br

Resumo: Probióticos são suplementos alimentares de microrganismos vivos com efeitos benéficos no hospedeiro animal pela melhora do balanço intestinal. Dentre os microrganismos considerados probióticos, somente aqueles microrganismos classificados como LAB são considerados de importância em relação à alimentação. Este trabalho tem por objetivo a avaliação da resistência na forma livre e imobilizada de *Lactobacillus plantarum* frente às condições de armazenamento sob refrigeração e trânsito gastrointestinal. O meio intestinal simulado não interferiu na viabilidade dos microrganismos em relação ao meio controle. Já o meio gástrico simulado diminuiu drasticamente a viabilidade dos microrganismos nas condições testadas não havendo diferença significativa entre os diferentes materiais imobilizantes utilizados e o controle sem imobilização. No armazenamento sob refrigeração houve aumento da viabilidade em relação às células não imobilizadas, sendo que os tratamentos em que houve menor perda de viabilidade foram imobilização em 4 % de pectina, 3 % de alginato de sódio recoberto com quitosana e mistura de 2 % de alginato de sódio e 2 % de pectina. Quando testada a viabilidade em iogurte de *L. plantarum* imobilizados em 3 % de alginato recoberto com quitosana houve perda de viabilidade de 0,55 ciclo logarítmico durante 38 dias de armazenamento.

Palavras-chave: *Lactobacillus plantarum*, imobilização, viabilidade

1 Introdução

O termo probiótico é considerado como uma palavra relativamente nova cujo significado é *for life* e é usado para referir-se àqueles microrganismos associados com efeitos benéficos em humanos e animais (FAO/WHO, 2001). A observação original do papel positivo desempenhado por algumas bactérias selecionadas é atribuída a Eli Metchnikoff no início do século XX (METCHNIKOFF, 1907). Contudo, o termo probiótico só foi criado nos anos 60' para nomear substâncias produzidas por microrganismos que promovessem o crescimento de outros microrganismos. No final da década de 80, para delimitar a natureza microbiana dos probióticos o termo foi redefinido como sendo "suplementos alimentares de microrganismos vivos com efeitos benéficos no hospedeiro animal pela melhora do balanço intestinal" (FAO/WHO, 2001).

A definição do termo probióticos teve um contínuo aprimoramento e uma das mais utilizadas é a dada pela Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*), na qual probióticos são microrganismos que são administrados em quantidades adequadas conferindo benefícios à saúde do hospedeiro (DE VRIES *et al.*, 2006).

É bastante claro nas definições apresentadas de probióticos que elas devem conter: a) o uso restrito da palavra probiótico a produtos que contenham microrganismos vivos; b) necessidade de ser apontada a dose de bactérias probióticas adequada para exercer o efeito desejado (FAO/WHO, 2001).

Cepas probióticas são selecionadas por sua aplicação potencial com base em propriedades fisiológicas e funcionais, algumas destas podendo ser determinadas *in vitro*. A classificação e a identificação de um probiótico podem dar uma forte indicação do habitat típico e origem. A espécie, ou até mesmo o gênero, pode também indicar a segurança e a aplicabilidade técnica do microrganismo em produtos probióticos (HOLZAPFEL *et al.*, 2001).

A passagem gastrointestinal, que envolve a exposição ao pH ácido estomacal, sais biliares e enzimas, representa a maior barreira à sobrevivência dos probióticos (CHAMPAGNE *et al.*, 2005; STANTON *et al.*, 2005). Para que uma cepa probiótica exerça o efeito benéfico no seu hospedeiro, esta deve ser capaz de sobreviver à passagem através do trato gastrointestinal de quem a consome (MARAGKOUKAKIS *et al.*, 2006). Por este fato, a tolerância ao ácido e à bile estão entre os critérios para a seleção de cepas probióticas (STANTON

et al., 2005).

Membros dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os principais probióticos reconhecidos, mas não são os únicos. No entanto, somente aqueles microrganismos classificados como LAB são considerados de importância em relação à alimentação (HOLZAPFEL *et al.*, 2001). *Lactobacillus plantarum* é uma versátil LAB que é encontrada em uma ampla faixa de ambientes. Este microrganismo tem uma longa história de uso seguro em produtos alimentícios como o chucrute e as preparações com azeitonas. Dentre centenas de estudos, pouquíssimos sugerem que *L. plantarum* esteja envolvido com infecção (DE VRIES *et al.*, 2006).

Os efeitos benéficos promovidos pelas bactérias probióticas têm levado ao aumento do uso destas em diversos tipos de produtos alimentícios. No entanto, a sua viabilidade nestes produtos muitas vezes é baixa e a habilidade de sobreviver e multiplicar no hospedeiro influencia fortemente os benefícios que os probióticos podem ocasionar. Os probióticos devem ser metabolicamente estáveis e ativos no produto, sobreviver à passagem do trato digestivo superior em grande quantidade, aderir e colonizar o intestino daquele que o consome.

Microencapsulação de várias culturas bacterianas incluindo as probióticas tem sido uma prática comumente utilizada para aumentar a viabilidade durante a estocagem e as convertendo em pós para a sua fácil utilização. Encapsulação em esferas de hidrocolóides aprisiona ou imobiliza as células dos microrganismos dentro da matriz, o que pode promover proteção nestes meios (KRASAEKOPT *et al.*, 2003).

Diversos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de investigar o papel protetor que a imobilização pode promover em relação às condições adversas as quais os probióticos podem ser expostos (CAPELA *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2006; MANDAL *et al.*, 2006; MICHIDA *et al.*, 2006; ÖZER *et al.*, 2009; SHEU e MARSHALL, 1993; SULTANA *et al.*, 2000).

O objetivo do presente trabalho é avaliar a resistência na forma livre e imobilizada de *Lactobacillus plantarum* frente às condições de armazenamento sob refrigeração e condições gastrointestinal simuladas. Também será avaliada a resistência sob refrigeração de *L. plantarum* imobilizado em alginato com recobrimento com quitosa em iogurte.

2 Materiais e Métodos

2.1 Microrganismo

Culturas estoques de *Lactobacillus plantarum* isolado de queijo Serrano (SOUZA, 2002) foram mantidas congeladas a -18 °C em suspensões de caldo MRS contendo 20% de glicerol.

2.2 Imobilização de *Lactobacillus plantarum*

A imobilização de *L. plantarum* através da técnica de microencapsulação por emulsão foi realizada com alginato de cálcio e/ou pectina. A técnica utilizada é baseada naquela apresentada por Sheu e Marshall (1993). Também foi realizado o recobrimento das esferas de material

imobilizado com alginato de sódio e quitosana adaptando-se o método descrito por Krasaekopt *et al.* (2004).

2.2.1 Preparo da cultura concentrada de células

Foi inoculado 1,5 mL de cultura estoque em glicerol de *L. plantarum* em frascos erlenmeyer de 1L contendo 200 mL de caldo MRS. Este foi incubado em *shaker* a 37 °C, 180 rpm até a DO atingir o valor 1. Foram utilizados o equivalente a 1000 mL de caldo MRS com a DO 1 para cada ensaio de imobilização. O caldo fermentado foi centrifugado (5000 g, 15 min, 4°C) enxaguado com água destilada estéril e ressuscitado em 10 mL de água destilada estéril. Esta solução foi misturada com o polímero imobilizante e conectada ao sistema de imobilização.

A suspensão de células livres de *L. plantarum* foi preparada utilizando uma cultura de 1000 mL que foi cultivada em meio MRS em *shaker* rotatório a 180 rpm a 37°C até atingir DO igual 1. Esta foi centrifugada (5000 g, 10 min, 4 °C), o *pellet* foi lavado duas vezes com água destilada estéril e finalmente ressuscitado em 100 mL de água destilada estéril.

2.2.2 . Preparação das esferas

A Figura 1 ilustra o diagrama esquemático do sistema de microencapsulação utilizado nos experimentos. As células de *L. plantarum* foram confinadas pela mistura de uma parte de cultura concentrada de células (apresentada no item 2.2.1.) com quatro partes do polímero imobilizante. A Tabela 1 apresenta os tratamentos com diferentes polímeros empregados para a imobilização de *L. plantarum*. Uma parte da mistura do polímero utilizado e células (50 mL) foi então adicionada a 5 partes de óleo (250 mL em frasco de 1L) contendo Tween 80 (0,2%), que foi agitado com barra magnética a 200 rpm. A nova mistura foi agitada por 10 min para a formação de uma emulsão uniforme sem a evidência de uma fase aquosa. Depois de transcorrido 10 min, 500 mL de cloreto de cálcio (0,05M para ALG ou 0,10M para PEC ou ALPE) foi adicionado rapidamente mas gentilmente (20 mL s⁻¹) escorrendo pela parede do frasco até que a emulsão água/óleo fosse quebrada. As esferas de alginato de cálcio foram formadas dentro de 10 min. As esferas foram coletadas por centrifugação (350 g, 10 min, 4 °C) e enxaguadas duas vezes com água estéril. O *pellet* foi ressuscitado em 50 mL de água destilada estéril para os ensaios posteriores. Todo o procedimento foi realizado sob condições de esterilidade.

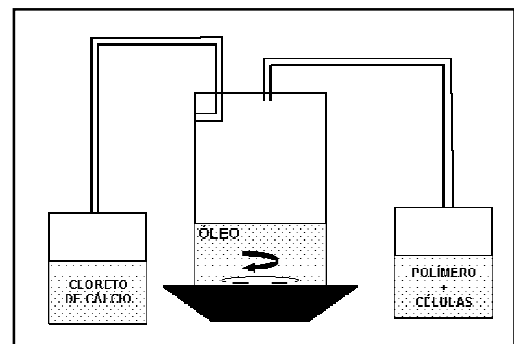


Figura 1. Diagrama esquemático do sistema de microencapsulação pela técnica de emulsão.

Tabela 1. Tratamentos empregados na imobilização de *L. plantarum*.

Tratamento	Sigla
Células sem imobilização	SIMO
Esferas elaboradas com alginato de sódio 3% (p/v)	ALG
Esferas elaboradas com pectina cítrica 4% (p/v)	PEC
Esferas elaboradas da mistura de alginato de sódio 2% (p/v) e pectina cítrica 2% (p/v)	ALPE
Esferas elaboradas com alginato de sódio 3% (p/v) recobertas com solução de alginato 0,17% (p/v)	ALGA
Esferas elaboradas com pectina cítrica 4% (p/v) recobertas com solução de alginato 0,17% (p/v)	PECA
Esferas elaboradas da mistura de alginato de sódio 2% (p/v) e pectina cítrica 2% (p/v) recobertas com solução de alginato 0,17% (p/v)	ALPEA
Esferas elaboradas com alginato de sódio 3% (p/v) recobertas com solução de quitosana 0,4% (p/v)	ALGQ
Esferas elaboradas com pectina cítrica 4% (p/v) recobertas com solução de quitosana 0,4% (p/v)	PECQ
Esferas elaboradas da mistura de alginato de sódio 2% (p/v) e pectina cítrica 2% (p/v) recobertas com solução de quitosana 0,4% (p/v)	ALPEQ

2.2.3 Recobrimento com alginato

O procedimento de recobrimento das esferas de imobilizado com alginato de sódio seguiu o descrito por Krasaekoopt, Bhandari, Deeth (2004). As esferas com *L. plantarum* imobilizado obtidas como descrito no item 2.2.2 foram misturadas com 100 mL de solução de alginato de sódio 0,17% e colocadas em sob agitação a 100 rpm, 37 °C por 20 min em *shaker* orbital. Após transcorrido este período as esferas com recobrimento de alginato foram recolhidas por centrifugação (350 g, 10 min, 4 °C) e enxaguadas duas vezes com água estéril. O *pellet* foi ressuscitado em 50 mL de água destilada estéril para os ensaios posteriores. A Tabela 1 apresenta os tratamentos empregando recobrimento de alginato.

2.2.4 Recobrimento com quitosana

O procedimento de recobrimento com quitosana foi adaptado de Krasaekoopt, Bhandari, Deeth (2004). 0,4 g de quitosana foi dissolvida em 90 mL de água destilada acidificada com 0,4 mL de ácido acético glacial até alcançar a concentração final de 0,4% (p/v). O pH foi então ajustado com NaOH 1M até atingir 5,8±0,2. A mistura foi filtrada através de papel filtro Whatman n.4 e o volume foi ajustado a 100 mL. Após foi autoclavado a 121°C por 15 min. As esferas com *L. plantarum* imobilizado obtidas como descrito no item 2.2.2 foram misturadas com 100 mL da solução de quitosana a colocadas sob agitação a 100 rpm, 37°C por 40 min em *shaker* orbital. Após transcorrido este período elas foram recolhidas por centrifugação (350 g, 10 min, 4 °C) e enxaguadas duas vezes com água estéril. O *pellet* foi ressuscitado em 50 mL de água destilada estéril para os ensaios posteriores.

2.3 Testes de resistência aos meios gastrointestinais

2.3.1 Meios para testes de tolerância ao trânsito gastrointestinal

Os sucos gástrico e intestinal simulados foram preparados diariamente. Os meios simulados foram elaborados baseando-se nos trabalhos de Charteris *et al.*

(1998) e Michida *et al.* (2006). O suco gástrico simulado (SGS) foi preparado pela suspensão de pepsina (1:10000) em solução salina estéril (0,5 %, p/v) até uma concentração final de 3 g L⁻¹ e o pH foi corrigido até 2,0 com HCl concentrado ou NaOH 0,1 mol L⁻¹ usando um medidor de pH. O suco intestinal simulado (SIS) foi preparado pela suspensão de pancreatina USP (P-1500, Sigma) em solução salina estéril até uma concentração final de 1g L⁻¹, com 4,5% de sais biliares e o pH foi ajustado a 8,0 com NaOH 0,1 mol L⁻¹ usando um medidor de pH. Ambas soluções foram filtradas para sua esterilização em membrana filtrante de 0,22 µm.

2.3.2 Teste de tolerância ao trânsito gastrointestinal

A tolerância das células livres e imobilizadas de *L. plantarum* aos meios gástrico e intestinal simulados foi determinada segundo o método adaptado de Charteris *et al.* (1998). Os testes foram realizados em tubo de falcon de 15 mL, previamente esterilizados. Foram realizados três tipos de testes. No primeiro e no segundo, 0,4 mL da suspensão de células livres ou imobilizadas foram misturadas a 1,8 mL de SGS ou SIS, misturados levemente e colocados sob incubação por 120 min a 37°C. No terceiro, primeiramente 0,4 mL da suspensão de células livres ou imobilizadas foram misturadas levemente a 1,8 mL SGS e colocados sob incubação por 120 min a 37°C. Ao final do período, 1,8 mL de SIS foi adicionado a amostra, misturado e procedeu-se mais 120 min de incubação a 37°C. Como controle para os dois primeiros testes (CONT12), foi incubado 0,4 mL da suspensão de células livres ou imobilizadas em 1,8 mL de solução salina (0,5%, p/v) estéril por 120 min a 37°C e, como controle para o terceiro teste (CONT3) foi incubado 0,4 mL da suspensão de células livres ou imobilizadas em 1,8 mL de solução salina (0,5%, p/v) estéril por 120 min a 37°C e adicionado no tempo de 120 min mais 1,8 mL de solução salina (0,5%, p/v) estéril, misturado e colocado para incubar por mais 120 min a 37°C. Alíquotas de 1 mL foram tomadas nos tempos 0, 30, 60, 120 min (para todos os testes), 180 e 240 min (para o terceiro teste e seu controle) para a determinação do número total de células viáveis.

2.3.3 Dissolução das esferas

As esferas de imobilizado de ALG, PEC, ALPE, ALGA, PECA e ALPEA foram dissolvidas utilizando 1 mL do material incubado que foi dissolvido em 9 mL de tampão fosfato, pH 7,5, por 10 min em *shaker* a 37°C e 180 rpm. Já as esferas de imobilizados que foram recobertas com solução de quitosana foram dissolvidas utilizando 1 mL do material incubado adicionado em 9 mL de tampão citrato de sódio, pH 6,0, na presença de 10 esferas de vidro, por 10 min em *shaker* a 37°C, 180 rpm. A nova solução formada foi então utilizada para determinação do número de células viáveis.

2.3.4 Determinação do número total de células viáveis

O número total de células viáveis de *L. plantarum* foi determinado pelo método de *pour plate* usando ágar MRS. As placas foram incubadas a 37°C por 48h.

2.4 Teste de resistência à condição de refrigeração

No teste de resistência à condição de refrigeração 0,4 mL da suspensão de células livres ou imobilizadas foram adicionadas em 1,8 mL de solução salina (0,5%, p/v) estéril e incubadas em geladeira a 4°C. Alíquotas de 1 mL foram tomadas durante 38 dias para a determinação do número total de células viáveis (item 2.3.4.). A dissolução das esferas de imobilizado foi realizada conforme descrito no item 2.3.3.

2.5 Produção de iogurte suplementado com *L. plantarum* imobilizado em alginato recoberto com quitosana

O iogurte foi produzido de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 2. Foi utilizada como cultura *starter* para a produção do iogurte Yo-Flex® YF-L812 (Christian Hansen, Brasil) composto de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

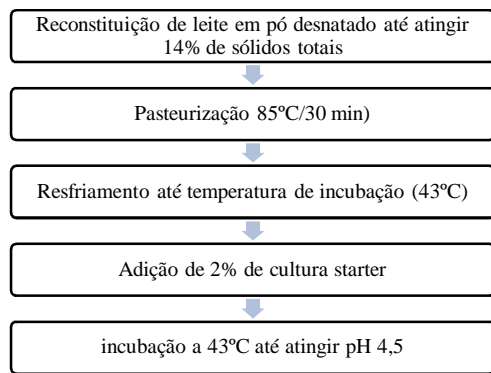


Figura 2. Fluxograma de produção de iogurte.

Após o iogurte atingir o pH 4,5, foram colocados 1,8 mL de iogurte em tubos falcon estéreis de 15 mL e adicionados a estes 0,4 mL de *L. plantarum* imobilizado em ALGQ e estocadas em geladeira a 4°C por 38 dias. Alíquotas de 1 mL foram tomadas durante 38 dias para a determinação do número total de células viáveis de *L. plantarum*. Para esta determinação foi utilizado o meio seletivo diferencial para *L. plantarum* (LPSM) descrito por Bujalance *et al.* (2006). O meio consistia em g L⁻¹: peptona bacteriológica, 10; extrato de carne, 10; extrato de levedura, 10; D-sorbitol, 20; ciprofloxacina, 0,004; acetato de sódio, 5; citrato de amônia, 2; fosfato de potássio, 2; sulfato de magnésio, 0,1; sulfato de manganês, 0,05; púrpura de bromocresol, 0,02; ágar, 20. O meio sem ciprofloxacina foi autoclavado por 15 min a 121°C e após resfriado a 50°C. A ciprofloxacina foi esterilizada por filtração antes de ser adicionada ao meio resfriado com membrana filtrante de 0,22 µm. O pH do meio foi ajustado a 6,0 ± 0,1. O meio quando solidificado apresenta coloração púrpura e o *L. plantarum* quando cresce neste meio desenvolve coloração amarela ao redor das colônias pela formação de ácido. A dissolução das esferas de imobilizado foi realizada conforme descrito no item 2.3.3.

3 Resultados e Discussões

3.1 Resistência aos meios gastrointestinais

Um dos principais critérios para seleção de probióticos é a avaliação da sua tolerância em relação ao pH estomacal, aos sais biliares e às enzimas presentes no

trato gastrointestinal superior (CHAMPAGNE *et al.*, 2005; STANTON *et al.*, 2005). Dessa forma, foram realizados estudos para avaliar a viabilidade *in vitro* dos probióticos quando expostos aos sucos gástrico e intestinal simulados. O SGS apresentava em sua formulação pepsina e seu pH foi ajustado para dois. Já o SIS era composto por pancreatina, sais biliares e seu pH corrigido para oito.

A Figura 3 apresenta as curvas de sobrevivência do *L. plantarum*, na forma livre e imobilizada em ALG e ALPE, quando colocados em contato com o SIS. Nestes experimentos o SIS não apresentou diminuição na viabilidade dos microrganismos em relação ao controle, exceto para o experimento sem imobilização no qual houve uma ligeira diminuição, 0,2 e 0,4 ciclos logarítmicos para controle e SIS, respectivamente. Michida *et al.* (2006) verificaram que *L. plantarum* na forma livre resistiu à exposição ao suco intestinal simulado. Mandal *et al.* (2006) verificaram a diminuição na viabilidade dos probióticos livres de 9,45 para 7,29 log UFC mL⁻¹ e de 9,34 para 5,60 log UFC mL⁻¹ quando expostos a 1 e 2 % de sais biliares, respectivamente após 12 h. Quando utilizaram a imobilização em alginato, verificaram o aumento da viabilidade, que foi proporcional ao aumento da concentração de alginato utilizada. Dessa forma, para as demais imobilizações não foram realizados ensaios de resistência a suco intestinal já que este não diminui a viabilidade de *L. plantarum*.

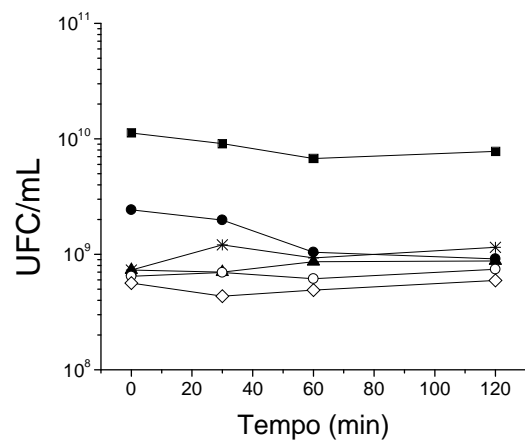


Figura 3. Variação de número de células viáveis de *L. plantarum* quando submetido à SIS com seus respectivos controles. (■) controle sem imobilização; (●) SIS sem imobilização; (▲) controle ALG; (*) SIS + ALG; (○) controle ALPE; (◇) SIS ALPE.

A Figura 4 apresenta a variação do número de células viáveis de *L. plantarum* durante a exposição à SGS. A exposição ao SGS ocasionou uma drástica diminuição do número total de sobreviventes sendo que não houve diferença significativa entre os tratamentos a 95% de confiança. A imobilização com estes materiais não foi efetiva como técnica para proteger os microrganismos. Este resultado está em concordância com o observado por Sultana *et al.* (2002) que também verificaram queda expressiva quando os probióticos foram expostos ao pH dois, sendo que a imobilização não protegeu-os das condições adversas. Mandal *et al.* (2006) observaram grande diminuição na viabilidade das células livres quando submetidos ao pH 1,5, contudo houve um

ligeiro aumento na viabilidade com os probióticos que foram imobilizados.

É importante ressaltar que os meios simulados usados nos testes podem diferir significativamente na literatura. Em relação ao meio gástrico simulado, a maioria dos autores utilizam somente a solução salina com pH corrigido ao ponto de estudo (LEE e HEO, 2000), poucos colocam em sua formulação enzimas (CHARTERIS *et al.*, 1998; MICHIDA *et al.*, 2006). O mesmo ocorre para suco intestinal simulado em que alguns trabalhos utilizam solução salina com diferentes concentrações de sais biliares (MANDAL *et al.*, 2006). Já outros autores empregam a pancreatina associada aos sais biliares (MICHIDA *et al.*, 2006).

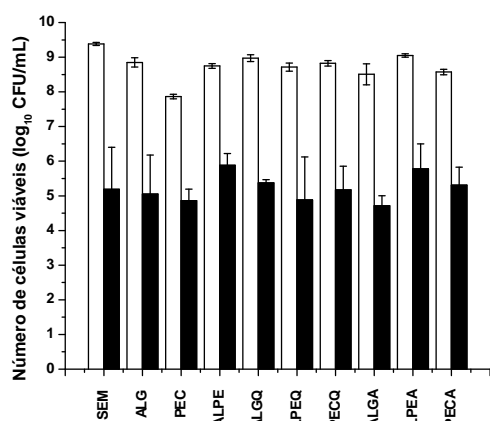


Figura 4. Variação do número de células viáveis de *L. plantarum* submetido a SGS entre tempo 0 e 120 min. (barra brancas) número inicial de células (barras pretas) número final de células.

3.2 Resistência à condição de refrigeração

Um dos parâmetros para que um determinado microrganismo seja considerado probiótico é a sua capacidade de resistir durante o período de estocagem do produto no qual estará inserido (FAO/WHO, 2001; KOSIN e RAKSHIT, 2006). Geralmente, os produtos fermentados adicionados de probióticos devem ser armazenados durante a sua vida-de-prateleira sob refrigeração (~ 4 °C). Com o objetivo de avaliar a eficiência da imobilização em alginato de cálcio em diminuir as perdas durante a estocagem sob refrigeração de *L. plantarum*, foram realizados experimentos em que foi comparada a sobrevivência do microrganismo imobilizado em relação às células livres.

Na Tabela 2 é apresentada a sobrevivência de *L. plantarum* em geladeira por um período de 38 dias. Pode ser observado que, no final do período, as células imobilizadas em PEC e ALGQ tiveram as menores perdas de viabilidade nas condições testadas em relação às células não imobilizadas. Contudo, observou-se a instabilidade da imobilização com pectina 4 % durante o período de estocagem, ou seja, havia a solubilização das esferas e separação das células do material imobilizado. Já a imobilização com ALGQ apresentou boa estabilidade e também houve pequena perda de viabilidade do *L. plantarum* durante o período de estocagem. Krasaekoopt *et al.* (2003) comenta que tratamentos especiais, como cobertura das esferas, são utilizados para melhorar as

propriedades das esferas. Nestes processos a realização de ligações cruzadas com polímeros catiônicos, cobertura com outros polímeros, mistura com amido e incorporação de aditivos por melhorar a estabilidade das esferas.

Tabela 2. Redução de número de células viáveis de *L. plantarum* durante 38 dias de armazenamento sob refrigeração à 4°C.

Ensaio	Log ₁₀ (N ₀ /N)
PEC	1,95±0,08 ^a
ALGQ	2,17±0,49 ^a
ALPE	2,96±0,20 ^{a,b}
ALPEQ	3,62±0,22 ^{b,c}
PECQ	3,64±0,10 ^{b,c}
ALPEA	3,85±0,10 ^{b,c}
ALG	4,35±0,33 ^{c,d}
ALGA	5,28±0,92 ^d
PECA	5,40±0,71 ^d
SEM	6,73±0,13 ^e

3.3 Resistência à estocagem sob refrigeração em iogurte

A imobilização com ALGQ foi escolhida para verificação da manutenção da estabilidade de *L. plantarum* em iogurte. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10⁸ a 10⁹ UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante (BRASIL, 2008). A Figura 5 apresenta a viabilidade de *L. plantarum* imobilizado em ALGQ em iogurte em condições de estocagem sob refrigeração. Como pode ser observado, neste sistema houve boa manutenção da viabilidade do probiótico, tendo havido somente 0,55 ciclos logarítmicos de perda de viabilidade. O número de UFC/mL do produto manteve-se acima de 10⁹, indicando que este produto se enquadraria dentro da legislação brasileira podendo usar a alegação na embalagem de probiótico. Estes experimentos demonstram a eficiência da técnica em aumentar a sobrevivência dos lactobacilos estudados durante o armazenamento.

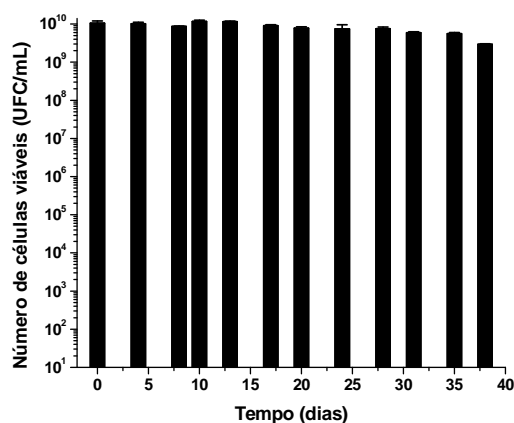


Figura 5. Viabilidade de *L. plantarum* imobilizado em ALGQ em iogurte em condições de estocagem sob refrigeração (4 ± 2°C).

4 Conclusão

A viabilidade de *L. plantarum* não foi afetada pelo SIS tanto na forma livre quanto imobilizada. Já o meio SGS diminui drasticamente a viabilidade do *L. plantarum* em todas as condições testadas. A imobilização em ALGQ foi eficiente na manutenção da estabilidade do probiótico sob condição de estocagem em temperatura de refrigeração e quando este método de imobilização foi usado em iogurte houve menor perda em relação ao meio salino previamente utilizado.

5 Referências

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos / Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos . Atualizado em julho de 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: dezembro de 2008.

BUJALANCE C., JIMÉNEZ-VALERA M., MORENO E., RUIZ-BRAVO A. A selective differential medium for *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Microbiological Methods*, v. 66, p. 572–575, 2006.

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

CHAMPAGNE, C.P.; GARDNER, N.J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 45, p. 61-84, 2005.

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

CHEN, K-N; CHEN, M-J; LIN, C-W. Optimal combination of the encapsulating materials for probiotic microcapsules and its experimental verification (R1). *Journal of Food Engineering*, v. 76, p. 313-320, 2006.

DE VRIES, M. C.; VANGHAN, E.E.; LEEREBEZEM, M.; DE VOS, W.M. *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 1018-1028, 2006.

FAO/WHO: Report on joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, 2001. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf. Acesso em: setembro de 2005.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. *American journal of clinical nutrition*,

v.73(suppl.), n.2, p. 365s-373s, 2001.

KOSIN, B.; RAKSHIT, S.K. Microbial and Processing Criteria for Production of Probiotics: A Review. *Food Technology and Biotechnology*, v. 44, n. 3, p. 371-379, 2006.

KRASAEEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Review: 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 Salt Solution. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 66, n. 2, p. 869-873, 2000.

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

MARAGKOUDAKIS, P.A. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 189-199, 2006.

METCHNIKOFF, E: Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: *The prolongation of life: Optimistic studies*. W. Heinemann, London: 161-183, 1907.

MICHIDA, H.; TAMALAMPUDI, S.; PANDIELLA, S.; WEBB, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. *Biochemical Engineering Journal*, v. 28, p. 73-78, 2006.

ÖZER, B; KIRMACI, H.A.; SENEL, E.; ATAMER, M.; HAYALOGLU, A. Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. *International Dairy Journal*, v. 19, p. 22-29, 2009.

SHEU, T.Y.;MARSHALL, R.T. Microentrapment of *Lactobacilli* in alginate gels. *Journal of Food Science*, v.54, n.3, p.557-561, 1993.

SOUZA, C.F.V. *Evolução das características microbiológicas durante a elaboração e maturação do queijo serrano*. Dissertação de mestrado, UFRGS, Faculdade de Agronomia, PPGMAA, Porto Alegre, 139f., 2002.

STANTON, C.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; SINDEREN, D.V. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 16, p. 198-203, 2005.

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