

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



Dissertação

**ATIVIDADE ANTAGONISTA DE *Lactobacillus brevis* E *Bifidobacterium lactis*
CONTRA *Streptococcus mutans* E SUA VIABILIDADE NA FORMA LIVRE E
MICROENCAPSULADA EM GOMA DE MASCAR**

Michelle Barboza Nogueira

PELOTAS, 2013.

Michelle Barboza Nogueira

**ATIVIDADE ANTAGONISTA DE *Lactobacillus brevis* E *Bifidobacterium lactis*
CONTRA *Streptococcus mutans* E SUA VIABILIDADE NA FORMA LIVRE E
MICROENCAPSULADA EM GOMA DE MASCAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de orientação:

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Prof. Dr^a. Ângela Maria Fiorentini

Pelotas, 2013.

Dados de catalogação na fonte:

(Gabriela Machado Lopes – CRB-10/1842)

M778a Nogueira, Michelle Barboza

Atividade antagonista de *Lactobacillus brevis* e *Bifidobacterium lactis* contra *Streptococcus mutans* e sua viabilidade na forma livre e microencapsulada em goma de marcar / Michelle Barboza Nogueira ; orientador Wladimir Padilha da Silva ; co-orientador Ângela Maria Fiorentini - Pelotas, 2013.-78f. ; il.- Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

1.Probióticos 2.Efeito antagônico 3.Bactéria cariogênica
I Silva, Wladimir Padilha da (orientador) II .Título.

CDD 576.163

Banca examinadora:

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva, Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Fiorentini, Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Prof^a. Dr^a. Maristela Cortez Sawitzki, Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

Prof. Dr. Fábio Renato Manzolli Leite, Universidade Federal de Pelotas – UFPel

*Dedico aos meus pais,
por todo o apoio, amor e esforços sem medida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, por ser a fonte de força nos momentos de dificuldade e por sempre guiar meus passos.

Aos meus pais, Ney e Noely, pelo apoio incondicional, incentivo, compreensão e principalmente, por todo o amor que dedicam a mim. Por me acalmarem nos momentos de nervosismo, pela paciência nos momentos de irritação, pelo carinho nos momentos de saudade e por comemorarem a cada conquista minha como se fosse a deles. Mesmo que longe, estão sempre perto. Sem eles nada seria possível. São tudo na minha vida!

A minha avó Isabel, que no auge de seus 80 e tantos anos, compreende que a distância e os longos períodos que ficamos sem nos ver são necessários para que os meus objetivos profissionais sejam alcançados. Pelo imenso carinho, torcida e apoio nas minhas decisões.

Aos demais familiares, pelo apoio e por torcerem pelo meu sucesso.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia, tanto “aos velhos” quanto “aos novos” por compartilharam comigo esses 2 anos de mestrado. A vocês, Mariana, Luana, Melina, Guilherme, Fábio, Paulo, Roger, Maiara, Tati, Karla, Milena, Simone, Greici, Joline, Darla, Júlia, Andréia, Vagna, Márcia e Carol, obrigada pelos ensinamentos, pelas conversas, pelos momentos de descontração e pelas tantas ajudas sempre que precisei.

Ao professor Wladimir Padilha da Silva, pela orientação e oportunidade.

À professora Ângela Maria Fiorentini, pela orientação, ensinamentos e por todo o apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao pessoal da UNIPAMPA de Uruguaiana, professora Maristela, professora Letícia, Maicon e Paola, pela recepção e ajuda na encapsulação das bactérias.

Ao professor Fábio, da Faculdade de Odontologia, por ceder a bactéria cariogênica.

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela oportunidade de realizar o curso de Pós-graduação.

Às colegas de mestrado Flávia e Isadora, pela amizade, pelo apoio e por sempre torcerem por mim.

Aos amigos da “terrinha”, aos de Pelotas e de outros pagos, que de uma forma ou de outra estão sempre ao meu lado. São fundamentais na minha vida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!!!

"Não sabendo que era impossível, foi lá e fez"

(Jean Cocteau)

RESUMO

NOGUEIRA, M. B. **Atividade antagonista de *Lactobacillus brevis* e *Bifidobacterium lactis* contra *Streptococcus mutans* e sua viabilidade na forma livre e microencapsulada em goma de mascar.** 2013. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

As bactérias ácido lácticas (BAL) são um grupo de micro-organismos que apresentam como principal característica em comum a capacidade de fermentar açúcares, produzindo ácido lático como produto majoritário ou como único produto de seu metabolismo fermentativo. Algumas espécies de BAL, destacando-se àquelas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, apresentam potencial probiótico, sendo capazes de conferir efeitos benéficos à saúde do hospedeiro, uma vez ingeridas vivas e em quantidades adequadas. Dentre as vantagens acarretadas pela ingestão de bactérias probióticas é possível citar o crescimento da população na microbiota intestinal, a atividade antagonista contra patógenos e a melhoria do sistema imunológico. Além disso, estudos comprovam que muitas BAL apresentam a capacidade de auxiliar no tratamento de algumas patologias, como na melhoria da digestão da lactose em indivíduos intolerantes a lactose, no tratamento de diarreia, para promover a redução do colesterol e para a prevenção de cáries. A ocorrência da cárie se dá em função da formação de uma cavidade na superfície dentária, causada pela destruição da proteína do esmalte por bactérias, destacando-se o *Streptococcus mutans*, por ser um dos micro-organismos mais relacionados a esse problema. Uma vez que BAL mostre-se capaz de inibir a bactéria cariogênica, torna-se interessante sua veiculação através de alimentos visando a prevenção da patologia. Com isso, o objetivo do trabalho foi verificar a atividade antagonista de *L. brevis* e *B. lactis* contra *S. mutans* e estudar a viabilidade destas bactérias aplicadas em goma de mascar microencapsuladas por atomização e na forma livre durante o período de estocagem analisados no intervalo de 8 em 8 dias, totalizando 33 dias. Ambos os micro-organismos testados apresentaram capacidade significativa de inibição da bactéria cariogênica, quando comparados ao anti-séptico bucal (clorexidina 0,2%), comprovando a influência de bacteriocinas no antagonismo através da sensibilidade a enzimas proteolíticas. A microencapsulação mostrou-se eficiente visto que a viabilidade das bactérias foi mantida após o processo. Durante o período de armazenamento das gomas de mascar acrescidas das bactérias livres e microencapsuladas, foram verificadas variações na viabilidade das mesmas. Em se tratando de *B. lactis*, a viabilidade foi

satisfatória ao fim do período no caso da bactéria microencapsulada, apresentando contagem superior a $8 \text{ Log UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$, porém insatisfatória no caso da bactéria livre, que apresentou redução quase total de sua viabilidade. Já para *L.brevis* a viabilidade do micro-organismo tanto livre quanto microencapsulado manteve-se elevada, atingindo os 33 dias com contagem superior a $8 \text{ Log UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Palavras-chave: probióticos; efeito antagônico; bactéria cariogênica.

ABSTRACT

NOGUEIRA, M. B. **Antagonistic activity of *Lactobacillus brevis* and *Bifidobacterium lactis* against *Streptococcus mutans* and their viability in free form and in microencapsulated gum.** 2013. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The lactic acid bacteria (LAB) are a group of micro-organisms that have as main characteristic in common the ability to ferment sugars, producing lactic acid as a major product or as only product of its fermentative metabolism. Some species of BAL, especially those belonging to the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, have potential probiotic, being able to confer beneficial health effects of the host, once eaten alive and in adequate quantities. Among the advantages brought about by the ingestion of probiotic bacteria can cite population growth in the intestinal microbiota, the antagonistic activity against pathogens and enhancing the immune system. Furthermore, studies have shown that many BAL have the capacity to assist in the treatment of certain pathologies, such as improving the digestion of lactose lactose intolerant individuals in the treatment of diarrhea, to promote the reduction of cholesterol and for the prevention of caries. The occurrence of caries occurs due to the formation of a cavity in the tooth surface caused by destruction of enamel protein by bacteria, especially *Streptococcus mutans*, as one of the micro-organisms related to this problem. Once show BAL is capable of inhibiting the cariogenic bacteria, it is interesting through food conveying aimed at preventing disease. Thus, the aim of this study was to determine the antagonistic activity of *L.* and *B. brevis lactis* against *S. mutans* and studying the viability of the bacteria applied in chewing gum microencapsulated by spray drying, in free form during the storage period in the range of 8 analyzed in 8 days, totaling 33 days. Both micro-organisms tested showed significant capacity to inhibit cariogenic bacteria when compared to oral antiseptic (chlorhexidine 0.2%), demonstrating the influence of bacteriocins in antagonism by sensitivity to proteolytic enzymes. Microencapsulation was effective because the viability of the bacteria was retained after the process. During the storage of chewing gum and free of bacteria added microencapsuladas, changes were observed in the viability of the same. In the case of *B. lactis* viability was satisfactory after the period in the case of microencapsulated bacteria, with count greater than $8 \text{ Log CFU. mL}^{-1}$, but with unsatisfactory in the case of bacteria free, which declined almost total viability. As for *L. brevis* the viability of micro-

organism both free and microencapsulated remained high, reaching 33 days with score greater than 8 Log UFC. mL⁻¹.

Keywords: probiotics; antagonistic effect; cariogenic bacteria.

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura do sal biliar	22
Figura 2 – Reação de desconjugação do ácido biliar catalisada pela enzima sal biliar hidrolase	23
Figura 3 – Alimentos acrescidos de bactérias probióticas comercializados no Brasil.....	26
Figura 4 – Estudos <i>in vitro</i> de bactérias ácido lácticas em condições da cavidade oral de humanos	32
Figura 5 – Estudos <i>in vivo</i> de bactérias ácido lácticas na cavidade oral de humanos.....	32
Figura 6 – Forma estrutural de uma micro-cápsula	33
Figura 7 – Estrutura da clorexidina	37
Figura 8 – Mini Spray Dryer BUCHI modelo B-290, Laboratório de Nanotecnologia/ Campus Uruguaiana	44
Figura 9 – Microscópio Eletrônico de Varredura Shimadzu modelo SSX-550 do Laboratório de Microscopia, pertencente ao Centro de Microscopia, localizado na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas.....	46
Figura 10 – Gomas de mascar contendo 0,95 g, a serem utilizadas para a aplicação de <i>B. lactis</i> microencapsulada (BLE) e liofilizada (BL), e <i>L. brevis</i> microencapsulada (LBE) e liofilizada (LB).....	47
Figura 11 – Zonas de inibição contra <i>S. mutans</i> formadas por <i>B. lactis</i> (≈15 mm), clorexidina 0,2% (anti-séptico bucal) (≈18,33 mm) e <i>L. brevis</i> (≈18,33 mm).....	54
Figura 12 – Produto final da microencapsulação por atomização de <i>L. brevis</i> e <i>B. lactis</i> utilizando solução de 2% de polivinipirrolidona e 5% de lactose como agente encapsulante.....	57
Figura 13 – Micrografias de MEV (Laboratório de Microscopia/Centro de Microscopia/Faculdade de Odontologia/ UFPel) de <i>L. brevis</i> antes e após microencapsulação por atomização com pvp e lactose como agentes	

encapsulantes: A (x 10000) – células livres (não microencapsuladas); B (x 1000) e C (x 5000) – microcápsulas.....61

Figura 14 – Micrografias de MEV (Laboratório de Microscopia/Centro Microscopia/Faculdade de Odontologia/ UFPel) de *B. lactis* antes e após microencapsulação por atomização com pvp e lactose como agentes encapsulantes: A (x 10000) – células livres (não microencapsuladas); B (x 1000) e C (x 5000) – microcápsulas.....62

Figura 15 – Gomas de mascar com a aplicação de *B. lactis* microencapsulada (BLE) e liofilizada (BL), e *L. brevis* microencapsulada (LBE) e liofilizada (LB), embaladas com papel couché e folha de alumínio, fechadas com adesivo.....66

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Materiais utilizados como agentes encapsulantes.....	35
Tabela 2 – Média do tamanho das zonas de inibição (mm) do controle (clorexidina) e das BAL frente a <i>S. mutans</i>	50
Tabela 3 – Média do tamanho dos halos de inibição (mm) das diferentes concentrações de clorexidina frente a <i>S. mutans</i>	51
Tabela 4 – Verificação da natureza da atividade antagonista das BAL e do controle positivo (<i>Lactococcus lactis</i>) através da sensibilidade às enzimas proteolíticas (pepsina, α -quimiotripsina, proteinase K e tripsina).....	53
Tabela 5 – Média da contagem de células viáveis de <i>L.brevis</i> e <i>B. lactis</i> antes e após o processo de liofilização.....	55
Tabela 6 – Média da contagem de células viáveis de <i>L.brevis</i> e <i>B. lactis</i> antes e após o processo de microencapsulação pelo método de atomização.....	58
Tabela 7 – Médias das contagens de células viáveis de <i>B. lactis</i> microencapsulada (BLE) e livre (BL) e <i>L.brevis</i> microencapsulada (LBE) e livre (LB) durante o período de armazenamento de 33 dias, analisada em 5 tempos distintos.....	63

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
OBJETIVOS	19
1. Objetivo geral	19
2. Objetivo específico.....	19
REVISÃO DE LITERATURA	20
1. Bactérias ácido lácticas.....	20
1.1 Probióticos	20
1.1.1 Características de bactérias probióticas	21
1.2 Probióticos e Alimentos	24
1.2.1 <i>Lactobacillus</i> spp.	26
1.2.1.1 <i>Lactobacillus brevis</i>	27
1.2.2 <i>Bifidobacterium</i> spp.	27
1.2.2.1 <i>Bifidobacterium lactis</i>	28
1.3 Probióticos e saúde	29
1.3.1 Cáries	29
1.3.1.1 <i>Streptococcus mutans</i>	30
1.3.2 Probióticos e cáries	31
2. Microencapsulação	32
2.1 Métodos de microencapsulação	33
2.1.1 Microencapsulação por atomização	34
2.2 Agentes encapsulantes	35
3. Goma de mascar	36

4. Clorexidina	36
MATERIAIS E MÉTODOS	38
1 Testes Preliminares <i>in vitro</i>	38
1.1 Atividade antagonista	38
1.1.1 Análise Estatística	39
1.2 Natureza protéica da atividade antagonista	40
1.3 Escolha das bactérias probióticas com maior potencial de inibição de <i>S. mutans</i>	41
2 Culturas Utilizadas	41
3 Produção de biomassa das culturas probióticas	41
4 Liofilização	42
4.1 Viabilidade após a liofilização	42
5 Microencapsulação	42
5.1 Preparação da solução do agente microencapsulante	42
5.2 Processo de microencapsulação	43
5.3 Rendimento da microencapsulação	44
5.4 Viabilidade das bactérias após o processo de microencapsulação	45
6 Microscopia Eletrônica de Varredura	45
7 Goma de mascar	46
8 Estudo da viabilidade das bactérias probióticas microencapsuladas e não microencapsuladas na goma de mascar	48
8.1 Aplicação das bactérias na goma de mascar	48
8.2 Condições de armazenamento	48
8.2.1 Embalagem	48
8.3 Contagem de células viáveis durante o armazenamento	48

8.3.1 Análise Estatística	48
RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
1 Atividade antagonista	50
1.1 Definição da concentração de clorexidina a ser utilizada como controle	50
1.2 Atividade antagonista de bactérias ácido lácticas contra <i>S. mutans</i>	51
1.3 Confirmação da atividade bacteriocinogênica	52
2 Viabilidade das culturas liofilizadas	54
3 Microencapsulação	55
3.1 Rendimento da microencapsulação	57
3.2 Viabilidade das bactérias após o processo de microencapsulação	58
4 Microscopia Eletrônica de Varredura	59
5 Estudo da viabilidade das bactérias probióticas microencapsuladas e não microencapsuladas na goma de mascar	63
CONCLUSÃO	67
CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
REFERÊNCIAS	69

INTRODUÇÃO

A busca dos consumidores por alimentos que propiciem, além da nutrição básica, algum benefício para a saúde, vem estimulando a comunidade científica a realizar estudos referentes a micro-organismos com potencial probiótico, especialmente bactérias (BADARÓ et al., 2008).

De maneira geral, para serem consideradas probióticas, as células bacterianas, após serem ingeridas, devem apresentar, dentre outros requisitos, a capacidade de sobrevivência às condições adversas a que são expostas no trato gastrointestinal, resistindo ao suco gástrico e a presença de sais biliares, conseguindo chegar até o intestino onde devem aderir-se e multiplicar-se, além de manter sua viabilidade e atividade metabólica (SAAD, 2006).

No que diz respeito a aspectos tecnológicos, é indispensável que as células bacterianas não promovam alterações indesejáveis nas características sensoriais dos produtos alimentícios, como a promoção de sabor e odor desagradáveis. Porém, quando são produzidos alimentos acrescidos de bactérias probióticas, a variável que desperta maior preocupação é a viabilidade das células bacterianas, visto que são encontradas dificuldades para manter contagens elevadas durante o período de vida útil de determinados alimentos, em função de suas características intrínsecas. (MATTILA-SANDHOLM et al., 1998; VASILJEVIC & SHAH, 2008). Com a finalidade de solucionar problemas tecnológicos, estudos são realizados no sentido de encontrar novas alternativas tecnológicas de manter a alta viabilidade desses micro-organismos por um maior período de tempo quando aplicados em alimentos. Para tanto, é possível citar o processo de microencapsulação, que objetiva aprisionar as bactérias dentro de uma microesfera, a partir de um material de recobrimento, impedindo o seu contato direto com o meio ao qual serão aplicadas, evitando que condições desfavoráveis diminuam sua viabilidade (BRINQUES, 2009; VILLENA et al., 2009).

A resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002, define probióticos como micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo. Alimentos acrescidos de tais micro-organismos vivos em quantidade igual ou superior a 8 Log UFC são considerados “alimentos probióticos”. Estes, por sua vez, enquadram-se na categoria

de “alimentos funcionais”, os quais são definidos como àqueles que além de fornecerem a nutrição básica, promovem a saúde.(ANVISA, 2002)

O consumo de alimentos probióticos mostra-se crescente devido aos efeitos benéficos conferidos ao organismo humano, como: a ativação do sistema imune, a síntese de vitaminas do complexo B e a modulação dos níveis de colesterol sérico, auxiliando na manutenção da saúde, e conseqüentemente reduzindo o risco de determinadas doenças (BADARÓ et al., 2008).

Segundo Isolauri et al. (2004) bactérias probióticas têm demonstrado influência positiva em casos de infecções do trato gastrointestinal e condições inflamatórias, através da capacidade antipatogênica e antiinflamatória que apresentam, possivelmente em conseqüência da modulação da microbiota intestinal. Além disso, estudos demonstram que os probióticos têm promovido efeitos capazes de auxiliar o tratamento de enfermidades, como no combate a tumores através de atividade anticarcinogênica, melhora na digestão da lactose por indivíduos lactase não persistentes, no tratamento de úlceras e gastrites e no caso de cáries através da atividade antagônica contra bactérias cariogênicas (AMORES et al., 2004; BADARÓ et al., 2008; LUYO, 2008; SOUZA et al., 2011).

A possibilidade da utilização de bactérias probióticas como alternativa de prevenção, ou até mesmo para combater cárie dentária, surge com o objetivo da busca de novas alternativas de prevenção. Dessa forma, pesquisas relacionadas à probióticos que apresentem atividade inibitória contra bactérias cariogênicas, bem como alimentos acrescidos desses micro-organismos, poderão contribuir para a melhoria da saúde oral (HE et al., 2009; STAMATOVA et al., 2009).

Diante do exposto, o presente trabalho buscou estudar a atividade antagonista de bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* contra a principal bactéria envolvida na formação da cárie, *Streptococcus mutans*, além de aplicar, àquelas que demonstrarem resultados satisfatórios, em goma de mascar na forma livre e microencapsulada pelo processo de atomização, analisando sua viabilidade em diferentes períodos de armazenamento.

OBJETIVOS

1 Objetivo Geral

Avaliar atividade antagonista de bactérias ácido lácticas *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. frente à bactéria cariogênica *Streptococcus mutans* e a viabilidade na forma livre e microencapsulada em goma de mascar.

2 Objetivos específicos

- Realizar testes *in vitro* com bactérias *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. frente a *S. mutans*, selecionando a(s) bactéria(s) com maior(es) atividade(s) antagonista(s);

- Microencapsular a(s) bactéria(s) com maior(es) atividade(s) antagonista(s) pelo método de atomização e verificar sua viabilidade;

- Aplicar as bactérias selecionadas microencapsuladas e livres em goma de mascar, verificando a viabilidade das mesmas durante o armazenamento.

REFERENCIAL TEÓRICO

1 Bactérias ácido lácticas

O grupo de micro-organismos que compreende as bactérias ácido lácticas (BAL) envolve 16 diferentes gêneros, que apresentam algumas características morfológicas, metabólicas e fisiológicas em comum. Os principais gêneros de BAL são *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Lactococcus*, sendo que, além destes, também estão incluídos os gêneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Bifidobacterium*, *Microbacterium* e *Propionibacterium* (HOLZAPFEL et al., 2001; LEROY e DE VUNYST, 2004).

São bactérias Gram positivas, catalase negativa, não esporuladas, com morfologia de cocos ou bacilos, podendo apresentar-se em células individuais ou em duplas, tétrades e em cadeias curtas ou longas. Em geral, são anaeróbicas e/ou aerotolerantes, produtoras de ácido láctico, como o maior ou único produto fermentativo do metabolismo, podendo ser heterofermentativas ou homofermentativas, respectivamente (LEROY e DE VUNYST, 2004; POFFO e SILVA, 2011). Em sua grande maioria, salvo a exceção do *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus capillatus* e uma espécie de *Lactobacillus* descrita como *ghanensis*, são micro-organismos que não apresentam motilidade (SETTANI e MOSCHETTI, 2010; POFFO e SILVA, 2011).

Muitas BAL apresentam propriedades que conferem benefícios à saúde, quando ingeridas vivas e em quantidades adequadas, sendo caracterizadas como bactérias probióticas, merecendo destaque para a sua aplicação em alimentos, os quais vêm sendo alvos de constantes pesquisas, e recebem a denominação de alimentos funcionais (DORELLA et al., 2003; SOCCOL et al., 2010).

1.1 Probióticos

Probióticos são definidos pela Food and Agricultural Organization (FAO, 2001) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2001) como micro-organismos vivos que administrados em quantidades suficientes promovem efeitos fisiológicos

benéficos sobre o hospedeiro. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ainda destaca que são capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal (BRASIL, 2002).

Bactérias denominadas probióticas são consideradas seguras (GRAS – “generally recognized as safe”) por não serem patogênicas e não apresentarem a capacidade de transmissão de fatores de resistência para patógenos, não representando riscos à saúde pública e garantindo a segurança de produtos alimentares acrescidos de tais micro-organismos (GOMES e MALCATA, 1999; OLIVEIRA et al., 2002).

1.1.1 Características de bactérias probióticas

Antes de um probiótico beneficiar a saúde do hospedeiro, é necessário cumprir inúmeros critérios relacionados com segurança, características tecnológicas e funcionais.

Aspectos de segurança incluem especificações como origem da bactéria e não ser um micro-organismo patogênico. Outro aspecto importante de segurança é a resistência a antibióticos. Idealmente, é interessante que os probióticos exibam tolerância a substâncias antimicrobianas usadas na prática clínica, porém não devem ser capazes de transferir essa resistência a outras bactérias da microbiota comensal ou oportunistas humanos (DEL PIANO et al., 2006).

Entre as propriedades tecnológicas que a(s) cultura(s) de um alimento probiótico deve(m) atender, destacam-se a viabilidade durante o processamento e estocagem, mantendo assim a funcionalidade do alimento, e o não desenvolvimento de sabores e/ou texturas indesejáveis, resistência a fagos e passíveis de serem produzidas em larga escala (DAVE & SHAH, 1998; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; ROSS et al., 2005; VASILJEVIC & SHAH, 2008).

Já no que diz respeito a características funcionais, as bactérias probióticas necessitam atender a um amplo espectro de requisitos, como persistência e viabilidade no trato gastrointestinal, que inicia-se com a sobrevivência à ação das enzimas salivares: α -amilase e ptialina, e ao pH da saliva humana, que, de maneira geral, encontra-se próximo à neutralidade, variando de 6,8 a 7,2 (MATTILA-SANDHOLM, 1998; MATTILA-SANDHOLM, 2002, SAAD, 2006).

Tolerância a acidez

Ao atingir o estômago, faz-se necessária a sobrevivência da bactéria ácido láctica à acidez do suco gástrico. O estômago apresenta pH muito ácido, podendo variar de 1,0 a 3,0, e as bactérias tendem a entrar em processo osmótico para equilibrar as cargas do meio. O pH interno das bactérias, que apresenta neutralidade (pH 7,0), não pode ser alterado pelo processo osmótico que ocorreria naturalmente, e é desta maneira que as bactérias probióticas se diferenciam das demais, em função da resistência à alteração do pH intracelular. Tal resistência se dá em função da presença da enzima ATP-sintase, a qual promove a expulsão dos prótons H^+ , que penetram a membrana buscando o equilíbrio do pH do meio com o interior do micro-organismo, impulsionando-os para fora da célula, impedindo a alteração do pH intracelular e mantendo, assim, a neutralidade do meio intracelular (MATTILA-SANDHOLM, 1998; MATTILA-SANDHOLM, 2002, SAAD, 2006).

Tolerância a alcalinidade

O obstáculo seguinte é a resistência à alcalinidade da bile, que abrange um princípio semelhante ao anterior, afim de não acarretar na desestabilização do pH interno. Os ácidos biliares primários são sintetizados no fígado a partir do colesterol e são conjugados com uma glicina ou taurina antes da secreção da bile. O grupo carboxílico do ácido biliar e do grupo amino do aminoácido são ligados por uma ligação amida, observado na figura 1.

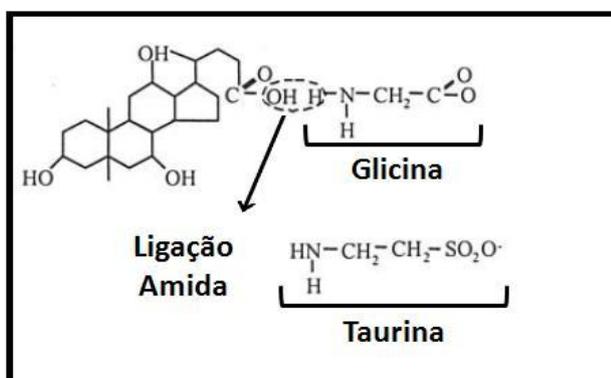


Figura 1 - Estrutura do sal biliar.

Fonte: Adaptado de BEGLEY et al., 2006.

A enzima sal biliar hidrolase, comum às bactérias probióticas, atua catalizando a reação de desconjugação, hidrolizando a ligação amida entre o ácido biliar e o aminoácido (Fig. 2), possibilitando a manutenção da neutralidade do pH interno da bactéria probiótica.

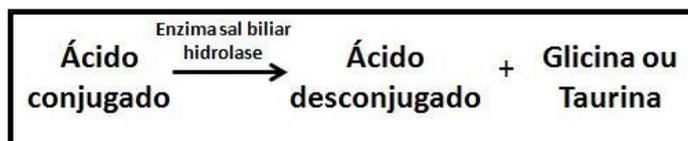


Figura 2 - Reação de desconjugação do ácido biliar catalisada pela enzima sal biliar hidrolase.

Fonte: Adaptado de BEGLEY et al., 2006.

Atividade de adesão

Após sobreviver a tais obstáculos, a bactéria ainda necessita colonizar o intestino delgado, superando os movimentos peristálticos e aderindo-se às células epiteliais. A propriedade de adesão está diretamente relacionada com a ação de adesinas bacterianas, presentes na parede celular das bactérias probióticas, que interagem com receptores da mucosa intestinal mediados através de um complexo de reações físico-químicas, que envolvem cargas e hidrofobicidade. Uma vez que ocorra a interação entre esses elementos, ocorre a fixação da bactéria nas células intestinais, impedindo sua eliminação, tanto pelo peristaltismo quanto por fluidos que tenderiam a direcioná-las para o exterior do organismo (BARBOSA et al., 2005).

Segundo Candela et al. (2008), os probióticos apresentam a capacidade de aderência em superfícies colonizadas anteriormente por bactérias enteropatogênicas, acarretando na sua exclusão ou redução, provavelmente em consequência do bloqueio de receptores que seriam utilizados pelas mesmas.

Atividade antimicrobiana

Dentro do contexto de sobrevivência do micro-organismo probiótico, ressalta-se a propriedade antagonista ou atividade antimicrobiana apresentada por

estes micro-organismos. Embora o modo de ação dos probióticos ainda não tenha sido completamente esclarecido, sugerem-se vários processos que podem atuar independentemente ou associados. Um deles é a exclusão competitiva, em que o probiótico competiria com os patógenos por sítios de fixação e nutrientes, impedindo sua ação transitoriamente (CROSS, 2002; CAPPOLA e TURNES, 2004). Outra forma que os probióticos encontram para atingir patógenos é através da síntese de bacteriocinas (NAIDU et al., 1999), de peróxido de hidrogênio (NAIDU et al., 1999), e de ácidos orgânicos voláteis (OGAWA et al., 2001) ou através da atuação sobre o metabolismo celular, promovendo a redução de amônia no organismo, e liberando enzimas como a lactase (DE VRESE et al., 2001).

Imunomodulação

Considerando as propriedades funcionais, os probióticos ainda devem apresentar a capacidade melhorar a imunidade do hospedeiro através de estímulo da atividade dos macrófagos e consequente aumento da produção de anticorpos (MATTILA-SANDHOLM, 2002, SAAD, 2006). Panchenian (2005) acrescenta que bactérias probióticas são capazes de modular a resposta imune do hospedeiro através da proliferação de células T e aumento da produção de imunoglobulinas e citocinas.

Em decorrência de interações entre moléculas conservadas da parede celular de bactérias probióticas com receptores das células do hospedeiro, ocorre o estímulo das vias de sinalização imune, gerando uma resposta imunológica, que pode variar de acordo com a linhagem da bactéria e o tipo de célula a qual se liga (OELSCHLAEGGER, 2010).

1.2 Probióticos e Alimentos

Alimentos acrescidos de probióticos em quantidades adequadas são enquadrados na categoria de alimentos funcionais, ou seja, alimentos que além de fornecerem a nutrição básica, promovem a saúde. Para tanto é necessário que a linhagem probiótica seja capaz de sobreviver à passagem através do trato gastrointestinal, chegando a quantidades adequadas ao intestino delgado, e nesse

seja capaz de se desenvolver para desempenhar seu papel benéfico (BRINQUES, 2009; SAAD, 2006).

A RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002 da ANVISA define que a quantidade mínima viável para o probiótico deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC. g^{-1} na porção diária do alimento para ser de importância fisiológica para o consumidor, visto que a ingestão desta concentração celular é reduzida até atingir o intestino (10^6 a 10^7 UFC. g^{-1}), porém suficiente para manter sua atividade funcional (ANVISA, 2002)

Os micro-organismos *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subespécie *thermophilus*, anteriormente classificados como probióticos, foram desconsiderados tendo em vista que além de serem espécies necessárias para produção de iogurte, não possuem efeito probiótico cientificamente comprovado.

As bactérias mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e, em menor escala, *Enterococcus faecium*. Dentre as bactérias lácticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, destacam-se *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. casei* - subsp. *paracasei* e subsp. *tolerans*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. Salivarius*. Já dentre as bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, destacam-se *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. animalis*, *B. longum* e *B. thermophilum* (PARVEZ et al., 2006; SAAD, 2006).

Inúmeros alimentos acrescidos de probióticos são comercializados no Brasil e no mundo, especialmente derivados lácteos. A figura 3 apresenta alguns exemplos de alimentos contendo bactérias probióticas disponíveis no mercado brasileiro.



Figura 3 - Alimentos acrescidos de bactérias probióticas comercializados no Brasil.
Fonte: A autora.

Inúmeras linhagens de bactérias probióticas são aplicadas de forma independente ou associada em alimentos, especialmente em derivados lácteos. É o caso do queijo Minas Frescal Sanbios, produzido pela empresa Santa Clara, que contém *B. lactis* (SANBIOS, 2012), e dos iogurtes produzidos pela Danone® como o Activia, que contém *B. animalis* (ACTIVIA, 2012), o Actimel sabor côco, acrescido de *L. casei imunitass*, e os demais sabores da linha Actimel (natural, morango, mix de frutas, laranja e acerola), acrescidos de *L. casei defensis* (ACTIMEL, 2012). Além disso, a Nestlé® comercializa a formulação infantil NAN, que apresenta a associação de *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.* Já a empresa Yakult® produz o leite fermentado Yakult, o Yakult 40 e a sobremesa fermentada Sofyl, sendo todos os produtos adicionados de *L. casei shirota* (YAKULT, 2012).

1.2.1 *Lactobacillus spp.*

Os micro-organismos pertencentes ao gênero *Lactobacillus* são Gram-positivos, catalase negativa, não esporulados, não apresentam motilidade e fermentam carboidratos produzindo, como principal produto, ácido láctico. São bactérias microaerófilas, portanto apresentam desenvolvimento ótimo em baixas concentrações de oxigênio, embora se desenvolva com facilidade em ambientes

anaeróbios e com certa dificuldade quando em aerobiose (GOMES E MALCATA, 1999).

Apresentam temperatura ótima de crescimento dentro da faixa de 30 a 40°C, embora se desenvolvam a temperaturas mais elevadas, desde que seja igual ou inferior a 45°C. O pH ótimo para o desenvolvimento dos lactobacilos situa-se na faixa de 5,5 a 6,0 e são capazes de tolerar ambientes ácidos de 0,3% a 1,9% de acidez titulável (GOKTEPE et al., 2006; OLMOS, 2006).

1.2.1.1 *Lactobacillus brevis*

Lactobacillus brevis é uma das espécies que constituem as Bactérias Ácido Lácticas (BAL), sendo classificada como probiótica, cujo principal metabólito produzido é o ácido láctico, dando preferência por fermentar substratos à base de glicose e galactose. Este micro-organismo pode se desenvolver em diferentes ambientes, podendo ser encontrado em inúmeros alimentos, especialmente fermentados, como é o caso do chucrute e do pickles. Também é comumente encontrado nos grãos de kefir, e esta espécie é responsável pela produção do polissacarídeo (dextrano) que forma os grãos. Além disso, essa bactéria é uma das causas mais comuns da deterioração da cerveja (PIDOUX, 1989; LIMA & CRISTIANINI, 2004).

1.2.2 *Bifidobacterium* spp.

As bifidobactérias são micro-organismos Gram-positivos, catalase negativa, não formadoras de esporos, não apresentam motilidade, são anaeróbios estritos e habitam naturalmente o trato gastrointestinal dos humanos. Bactérias deste gênero apresentam forma de bacilos finos com extremidades afiladas e geralmente bifurcados, medindo entre 2 e 8 μ de comprimento (OLMOS, 2006; SOLANO-AGUILAR et al., 2008).

Apresentam temperatura ótima de crescimento entre 37°C e 41°C, sendo possível o seu desenvolvimento a uma temperatura mínima de 25°C a 28°C e máxima de 43°C a 45°C, e suportam uma faixa de pH que pode variar de 4,5 a 8,5, com crescimento ótimo entre 6,5 e 7,0. Apresentam a capacidade de fermentar

açúcares como glicose, frutose e galactose, produzindo ácido acético e ácido lático, além de ácido succínico e CO₂, embora em pequenas quantidades (ROY, 2001; SHAH, 2007; JALILI et al., 2009).

As bifidobactérias constituem cerca de 5 a 10% do total de micro-organismos que colonizam o intestinos de crianças, diminuindo sua proporção a medida que a idade avança, em função, principalmente, das mudanças de hábitos alimentares, além de outros fatores como o uso de medicamentos, em especial antibióticos, que também influenciam no decréscimo da população de *Bifidobacterium* spp. no intestino de humanos. Na idade adulta os níveis correspondem a um percentual que varia de 3 a 6% da população intestinal, sendo inferior às populações de *Eubacterium* spp. e *Bacteroides* spp. (MITSUOKA, 2000; OLMOS, 2006; SHAH, 2007).

1.2.2.1 *Bifidobacterium lactis*

Bifidobacterium lactis é uma espécie diferenciada quando comparada às demais bactérias do mesmo gênero. Inicialmente esta bactéria era considerada uma espécie de *Lactobacillus*, e isso se deve ao fato de ser um micro-organismo que além de produzir ácidos, principalmente ácido lático, a partir da fermentação de açúcares, também é produtor de acetaldeído, diacetil e etanol sem a geração de CO₂. Entretanto, estudos permitiram descobrir inúmeras outras particularidades desse micro-organismo, entre elas a incapacidade de reprodução na presença de oxigênio, característica esta que resultou na inclusão da bactéria dentro do gênero *Bifidobacterium*, caracterizado por ser estritamente anaeróbio (BARON et al., 2000).

Segundo Olmos (2006) é um cultivo termófilo e apresenta sensibilidade a NaCl, sendo que a concentração de 2,5% causa inibição parcial, e o cultivo é totalmente inibido em meios contendo 3% de NaCl. São bactérias comumente aplicadas na elaboração de produtos lácteos, como iogurtes e queijos.

1.3 Probióticos e saúde

A influência benéfica sobre a microbiota intestinal humana causada pela ingestão de probióticos inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos. Desta forma, 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 defesa do hospedeiro (PUUPPONEN-PIMIÄ et al. apud SAAD, 2006). Além disso, bactérias probióticas vêm sendo utilizadas, através da bacterioterapia, no tratamento de algumas patologias, como substância principal ou adjuvante, como para a prevenção e tratamento de diarreia; como alternativa para evitar a prisão de ventre; para melhorar a digestão da lactose em pacientes intolerantes a esta; no tratamento de gastrite e úlceras; na prevenção e tratamento de tumores, infecções urinárias, doenças respiratórias e otite; para promover a redução do colesterol e até para a prevenção contra cáries (AMORES et al., 2004; LUYO, 2008; SOUZA et al., 2011).

1.3.1 Cárie

Segundo Kramer et al. (1997) cárie pode ser definida como uma destruição da superfície dentária, iniciada por descalcificação do esmalte, seguida por lise enzimática das estruturas orgânicas levando à formação de cavidades, causada por bactérias produtoras de ácidos e/ou quelatos, que levam à descalcificação ou por bactérias que destroem a proteína do esmalte.

As bactérias cariogênicas atuam fermentando os carboidratos presentes na cavidade oral em função da alimentação do indivíduo, resultando na formação de ácidos, como o láctico, acético, propionico e fórmico, que provocam uma diminuição de pH na interface placa-esmalte, podendo levar à dissolução do fosfato de cálcio do esmalte dos dentes susceptíveis, através da difusão do ácido através do esmalte permeável. Em consequência, a desmineralização atinge a dentina, destruindo gradualmente a estrutura dentária e originando a cavidade de cárie. Em determinado momento, as bactérias atingem a polpa e infectam-na, podendo

resultar numa resposta inflamatória pulpar e dos tecidos periapicais, sendo esta a causa mais comum de odontalgia. Se não tratada, esta infecção pode alastrar para o osso maxilar, tecido celular subcutâneo e circulação sanguínea, resultando, ainda que raramente, em situações que podem colocar em risco a própria vida do indivíduo (MELLO et al., 2006).

1.3.1.1 *Streptococcus mutans*

Inúmeras bactérias podem participar do processo de formação de cáries, porém, algumas mostram-se muito mais ativas que outras. É o caso do *Streptococcus mutans*, que é um dos micro-organismos mais relacionados a cáries em função do seu potencial de desenvolvimento e pela grande quantidade de ácido láctico produzida a partir da sacarose. Além disso, são capazes de manter seu metabolismo mesmo em pHs baixos, pois são acidúricos e aderem-se facilmente à superfície dentária em função da produção do polissacarídeo extracelular insolúvel, bem como de polissacarídeos intra e extracelulares de reserva que facilitam o processo cariogênico (MACPHERSON et al. apud NOGUEIRA et al, 2007).

A formação da cárie por este micro-organismo se deve à aderência na superfície dentária e subsequente formação de biofilme, ocorrendo em duas etapas. O primeiro estágio é a aderência reversível da célula bacteriana à película adquirida presente na superfície do esmalte, possibilitada através da produção de glucanos extracelulares insolúveis que propiciam que a bactéria se agregue ao dente. Este é o resultado da ação da enzima glicosiltransferase, que utiliza a sacarose oriunda da dieta humana e a decompõe em glucose que, conseqüentemente, irá formar os glucanos. O segundo estágio envolve a acumulação de *S. mutans* por intermédio de seu crescimento e pela produção de glucanos extracelulares.

Somente a partir da conclusão desses dois estágios que inicia-se o processo de formação da cárie. O que significa que a interrupção ou interferência de um desses mecanismos pode prevenir, evitar ou retardar a ocorrência da cárie (GONDIM, 2010).

Um fator importante é o substrato de fermentação, visto que alguns micro-organismos demonstram maior tendência a metabolizar açúcares específicos.

Estudos demonstram que a placa dental formada por *S. mutans* pela fermentação de lactose é diferente daquela formada pela sacarose. Isso se deve ao fato de que *S. mutans*, apresenta preferência por substratos que contenham sacarose, e fermenta-os com maior facilidade, aumentando a ocorrência da formação de cáries. Além disso, a lactose, não acarreta perda mineral clinicamente visível no esmalte, contrariamente ao que acontece com a sacarose (RIBEIRO; RIBEIRO, 2004).

1.3.2 Probióticos e cáries

Com a finalidade de diminuir a intensidade dos danos causados pelas cáries, bem como prevenir sua ocorrência, a utilização de probióticos têm se mostrado bastante interessante. Pesquisas *in vitro* demonstram que alguns micro-organismos probióticos apresentam a capacidade de aderir-se ao biofilme supragengival e competir com micro-organismos cariogênicos, obtendo resultados promissores (SULLIVAN, 2002). Estudos foram realizados com bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, com a finalidade de avaliar o potencial de colonização e adesão à superfície dentária, e demonstraram que além de apresentarem capacidade de adesão, permanecem viáveis na saliva humana durante períodos superiores a uma semana (PETTI , 2001; YLI-KNUUTTILA, 2006). Segundo Comelli et al. (2002) a presença de *Lactococcus lactis* no biofilme é capaz de modular o crescimento de bactérias orais, principalmente do *S. sobrinus*, o qual é sabidamente cariogênico.

Estudo *in vivo* realizados por Ahola et al. (2002) e Petti et al. (2001) demonstram que ministrar alimentos contendo probióticos resultam na diminuição de níveis salivares, especialmente de *S. mutans*. Em estudo realizados por Nikawa et al. (2004) e Çaglar et al. (2008) o *L. reuteri* foi apontado como um probiótico eficiente na inibição de *S. mutans*, em curto período de tempo, quando presente nos alimentos constantemente ingeridos pelos indivíduos avaliados. Tais estudos podem ser observados, mais detalhadamente, nas figuras 4 e 5.

ESTUDOS	RESULTADOS	FONTE
<i>Lactobacillus e Bifidobacterium</i> - Capacidade de aderência ao biofilme supragengival e competição com micro-organismos cariogênicos	Boa capacidade para ambos	SULLIVAN, 2002
<i>Lactobacillus e Bifidobacterium</i> - Potencial de colonização e adesão à superfície dentária	Boa capacidade para ambos; Permanecem viáveis na saliva humana durante períodos superiores a uma semana.	PETTI, 2001 YLI-KNUUTTILA, 2006
<i>Lactococcus lactis</i> – Competição com micro-organismos cariogênicos no biofilme dentário	Capaz de modular o crescimento de bactérias cariogênicas, principalmente do <i>Streptococcus sobrinus</i>	COMELLI et al., 2002

Figura 4 – Estudos *in vitro* de bactérias ácido lácticas em condições da cavidade oral de humanos.

ESTUDOS	RESULTADOS	FONTE
Ministrar alimentos contendo probióticos	Diminuição de bactérias cariogênicas, especialmente <i>Streptococcus mutans</i>	PETTI et al., 2001 AHOLA et al., 2002
Efeito de diferentes alimentos contendo <i>Lactobacillus reuteri</i> frente a <i>Streptococcus mutans</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i> foi apontado como um probiótico eficiente na inibição de <i>Streptococcus mutans</i>	NIKAWA et al., 2004 ÇAGLAR et al., 2008

Figura 5 – Estudos *in vivo* de bactérias ácido lácticas na cavidade oral de humanos.

2. Microencapsulação

Apesar dos inúmeros benefícios conferidos pelos probióticos à saúde dos consumidores, o maior problema encontrado quando deseja-se incorporar tais micro-organismos à formulação de um alimento, é a baixa resistência que estes

apresentam a diferentes condições em que são submetidos durante os processos tecnológicos de produção, das diferentes condições de pH, oxigênio e temperatura dos alimentos em que são aplicados, e das condições de armazenamento durante o período de vida útil dos produtos alimentícios (RUIZ-MARTINEZ et al., 2009).

Buscando a maior viabilidade e estabilidade dos probióticos, bem como o aumento do período de sua sobrevivência, inúmeras técnicas de imobilização de células vêm sendo estudadas, como uma alternativa de proteção através de uma barreira física que evite sua exposição às condições adversas do meio. A microencapsulação de bactérias probióticas consiste na formação de pequenas esferas formadas a partir de um material protetor, geralmente de natureza polimérica, que recobre pequenos conjuntos de células, aprisionando-as (BRINQUES, 2009; RUIZ-MARTINEZ et al., 2009). A Figura 6 apresenta a forma estrutural de uma micro-cápsula formada.

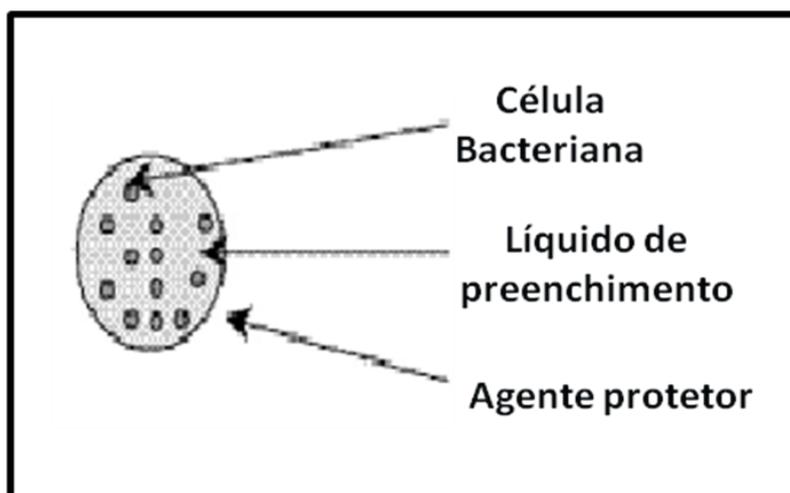


Figura 6 - Forma estrutural de uma micro-cápsula.

Fonte: A autora, 2013.

2.1 Métodos de microencapsulação

Existem inúmeros métodos utilizados para a formação de micro-cápsulas, os quais são divididos em 3 grandes grupos, de acordo com a natureza do processo: métodos físicos, métodos químicos e métodos físico-químicos.

Dentre os métodos físicos é possível citar a técnica de atomização ou *spray drying* e liofilização. No caso dos métodos químicos as técnicas mais comumente

utilizadas são a de emulsão ou polimerização interfacial, inclusão molecular e co-cristalização. Em se tratando de métodos físico-químicos, incluem-se a coacervação, gelificação iônica, extrusão e inclusão em lipossomas (AZEREDO, 2005; BRINQUES, 2009; RUIZ-MARTINEZ et al., 2009; CIPAGAUTA, 2010; HUERTAS, 2010).

Na escolha do método de microencapsulação deve-se levar em consideração inúmeros fatores, como a substância ou micro-organismo a ser encapsulado, as propriedades do agente encapsulante, do tamanho das esferas que deseja-se obter (visto que podem variar de 0,2-5000 μm dependendo do método utilizado), do alimento em que será aplicado, do mecanismo de liberação desejado e do custo (RUIZ-MARTINEZ et al., 2009; HUERTAS, 2010).

2.1.1 Microencapsulação por atomização

O processo de microencapsulação por atomização ou secagem por aspersão é um dos métodos mais antigos de encapsulação, tendo sido usado na década de 1930 para preparar os primeiros compostos de sabor encapsulados. O processo de formação das micro-cápsulas envolve 3 etapas: preparação da dispersão ou solução, homogeneização e atomização propriamente dita. Esta técnica consiste em atomizar o material que se encontra em estado líquido, seja como dispersão ou solução, formando pequenas gotas sobre uma corrente de ar quente. Ao ocorrer o contato das gotas com o ar aquecido, a elevada temperatura promove uma rápida evaporação do solvente, formando uma fina película do material de recobrimento em torno do material a ser encapsulado. O produto resultante encontra-se na forma de um pó fino, com partículas geralmente menores que 100 μm (AZEREDO, 2005; PARIZE et al., 2008; RUIZ-MARTINEZ et al., 2009; HUERTAS, 2010).

Este método é o mais utilizado na indústria de alimentos para a encapsulação de aditivos e ingredientes como vitaminas (C e E), ácido fólico, aromas, orégano, citronela, bactérias probióticas, lipídeos, ácido linoléico, óleos vegetais; minerais como o ferro; pigmentos como antocianinas e leite, entre outros, e apresenta um custo relativamente baixo. A principal vantagem desta técnica é a possibilidade de trabalhar com materiais termosensíveis, visto que o período de

exposição das partículas ao calor é curto (AZAREDO, 2005; WANDREY et al., 2010).

2.2 Agentes encapsulantes

Existem uma infinidade de materiais passíveis de utilização como agentes encapsulantes. Porém, as propriedades do material utilizado exerce influência direta na estabilidade dos compostos ou micro-organismos a serem microencapsulados. Desta maneira, torna-se essencial levar em consideração, no momento da escolha do agente encapsulante, uma série de fatores como porosidade, solubilidade, viscosidade, propriedades mecânicas, transição vítrea, capacidade de formação de filme, além de fatores econômicos (AZAREDO, 2005; RUIZ-MARTINEZ et al., 2009).

Diferentes substâncias que podem ser utilizadas como agentes encapsulantes podem ser observadas na tabela 1.

Tabela 1 - Materiais utilizados como agentes encapsulantes.

Tipo de material	Material específico
Gomas	Ágar, alginato de sódio, carragena, goma arábica.
Carboidratos	Amidos, dextrano, sacarose, lactose.
Celuloses	Etilcelulose, metilcelulose, acetilcelulose, nitrocelulose, carboximetilcelulose.
Lipídeos	Ceras, parafinas, óleos, gorduras.
Proteínas	Glúten, caseína, albumina.
Materiais inorgânicos	Sulfato de cálcio, silicatos.

Fonte: Adaptado de RUIZ-MARTINEZ *et al.* (2009).

3. Goma de mascar

Existem diversos veículos passíveis de serem utilizados para administração de bactérias probióticas, bem como micro-organismos de diferentes espécies capazes de exercer efeitos benéficos ao hospedeiro sobre a microbiota cariogênica, podendo atuar como um método auxiliar de controle de cáries (SOUZA, 2010). Desta forma, sugere-se que gomas de mascar podem servir de veículo de bactérias probióticas a serem ministradas em tratamento preventivo de cáries, uma vez que comprovada a ação inibitória frente a bactérias cariogênicas.

Segundo a RDC nº. 265 de 2005, goma de mascar é classificada como um alimento constituído por base gomosa, elástica, mastigável e não deglutível. Pode conter outros ingredientes, desde que não descaracterizem o produto e apresentar recheio, cobertura, formato e consistência variados (ANVISA, 2005).

4. Clorexidina

A clorexidina, cuja estrutura molecular pode ser observada na figura 7, foi aprovada para o uso em escovas cirúrgicas em meados de 70, e como colutório a 0,12%, no final da década de 80. Na Europa, foram utilizados soluções de clorexidina a 0,2%. A forma mais universalmente utilizada era através de bochechos de solução de clorexidina, realizados duas vezes ao dia, utilizando 10mL de uma solução de 0,2% de clorexidina. Estudos posteriores mostraram que diminuindo a concentração do produto e aumentando o volume bochechado da solução a quantidade de droga usada era praticamente a mesma e a efetividade anti-placa manteve-se semelhante com reduções do manchamento dos dentes. Assim, dois colutórios de clorexidina a 0,12% foram aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) no início dos anos 90, sendo tão eficazes clinicamente quanto a solução mais forte a 0,2%, porém com uma redução significativa na incidência de efeitos colaterais. Portanto a concentração a 0,12% com bochechos passou a ser empregada em larga escala, sendo utilizada nessa concentração no Brasil. Na Europa a concentração de 0,2% ainda é mantida e utilizada como padrão (NEOBRA, 2013).



Figura 7 – Estrutura da clorexidina.

Fonte: NEOBRAX, 2013.

A natureza catiônica da clorexidina permite a sua ligação a tecidos duros e moles na cavidade bucal (gengiva, tecidos das bochechas, palato duro e palato mole); a seguir, é liberada com o decorrer do tempo, produzindo um efeito bacteriostático contínuo. Em doses baixas, a integridade da membrana celular é alterada, resultando num extravasamento dos componentes bacterianos de baixo peso molecular (NEOBRAx, 2013).

MATERIAIS E MÉTODOS

As análises microbiológicas, incluindo os testes preliminares de atividade antagonista e natureza protéica da atividade antagonista contra *S. mutans*, o processo de liofilização, as contagens de células viáveis, a aplicação das bactérias liofilizadas e microencapsuladas e o estudo da viabilidade das bactérias aplicadas na goma de mascar durante o período de armazenamento, foram realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão.

A microencapsulação das bactérias probióticas foi realizada no Laboratório de Nanotecnologia da Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no Laboratório de Microscopia, pertencente ao Centro de Microscopia, localizado na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas.

1 Testes Preliminares *in vitro*

1.1 Atividade antagonista

Micro-organismos:

Bactérias ácido lácticas (BAL) *L. brevis* ATCC 367, *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* INC Q5 00383, *B. lactis* (DELVO PRO LAFTI B94 – Global Food) e *B. bifidum* Bb-12 (Chr. Hansen), mantidas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas.

Bactéria cariogênica *Streptococcus mutans* UA 159 (ATCC 700610), cedida pela Faculdade de Odontologia - UFPel.

Para a verificação da atividade antagonista foi realizado o teste “*spot on the law*” (teste da gota), utilizando-se as bactérias ácido lácticas (BAL) frente a bactéria cariogênica, segundo Jacobson et al. (1999)

Cultivou-se as cepas em caldo MRS (Man Rogosa and Sharpe) incubadas por 18-24 horas a 37°C. Logo padronizou-se a concentração celular através da solução padrão 1 de Mc Farland ($3,0 \times 10^8$ UFC . mL⁻¹), colocando-se uma alíquota de 2 microlitros em um ponto da placa com ágar MRS, incubando-as em jarra de anaerobiose a 37°C

durante 18-24 horas. Paralelamente cultivou-se o *S. mutans* em caldo BHI (Brain Heart Infusion) durante 18-24 horas a 37°C, que logo teve sua concentração celular padronizada através da solução padrão 0,5 de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC . mL⁻¹). Uma sobrecamada cobriu, então, as placas de MRS contendo as BAL, com 8 mL de ágar BHI (0,8%) inoculado com a cultura cariogênica. As placas foram novamente incubadas a 37°C por 24 horas em aerobiose. A inibição do crescimento da bactéria cariogênica foi observada através da formação de uma zona de inibição (halo) ao redor da gota medindo-se os diâmetros destas com paquímetro digital.

Os testes foram realizados em triplicada para cada uma das cepas de BAL e o tamanho das zonas de inibição foi comparado com a clorexidina (anti-séptico bucal), utilizada como controle positivo. Para a obtenção da zona de inibição do controle, utilizou-se a técnica de difusão em disco, colocando-se 2 microlitros de clorexidina sobre um disco sobreposto em placas com ágar MRS, realizando a cobertura com ágar BHI (0,8%) contendo a cultura bacteriana, seguindo o mesmo procedimento aplicado para as BAL.

Utilizou-se 3 diferentes concentrações de clorexidina (2% - solução de clorexidina comercial; 0,2% - solução de clorexidina padrão europeu; e 0,12% - solução de clorexidina padrão brasileiro), a fim de verificar a influência da concentração na inibição da bactéria cariogênica e definir a concentração a ser utilizada como controle do presente estudo.

1.1.1 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística, primeiramente à verificação da normalidade dos dados, através do teste de Shapiro-Wilk, análise de variância e aos testes de médias através do teste de Dunet ($p \leq 0,05$), comparando o diâmetro da zona de inibição das bactérias probióticas com o do controle (clorexidina), e do teste de Tukey ($p \leq 0,05$), comparando o diâmetro das zonas de inibição das bactérias probióticas entre si, utilizando-se o softwer SAS 9.2.

1.2 Natureza protéica da atividade antagonista

As bactérias que apresentaram atividade antagonista frente a *S. mutans* foram submetidas à confirmação da natureza protéica do antagonismo, segundo a técnica descrita por Harris et al. (1989), com adaptações. Este teste objetiva verificar a ocorrência ou não de interferência na zona de inibição, acarretada por enzimas proteolíticas. Desta maneira, levando-se em consideração que bacteriocinas são substâncias de caráter protéico, é possível inferir que enzimas proteolíticas degradam bacteriocinas, e que a interrupção do halo no local em que a enzima está presente indica que a mesma degradou a substância responsável pela inibição da bactéria cariogênica. Sabe-se que a atividade antagonista pode ocorrer em função de inúmeros metabólitos, além das bacteriocinas, produzidos pelas bactérias como ácidos orgânicos, que não são degradados por proteases. Desta maneira, confirma-se que a natureza da inibição se deu pela atuação de uma bacteriocina, no caso de interrupção do halo, ou por outro metabólito ou mecanismo, quando o halo não é interrompido. Deve-se utilizar mais de um tipo de enzima proteolítica para este teste, pois cada bacteriocina é sensível a uma ou mais enzimas específicas, conforme sua composição.

Através deste teste objetivou-se a confirmação da produção de bacteriocina pelas BAL, podendo-se inferir que este metabólito promove, sozinho ou em conjunto com outros metabólitos produzidos pelas cepas, a inibição do micro-organismo cariogênico.

As BAL foram semeadas em caldo MRS a 37°C por 18-24 horas, em aerobiose. Cinco alíquotas de 2 microlitros de cada cepa, com concentração celular aproximada de $3,0 \times 10^8$ UFC . mL⁻¹ (padrão 1 de Mc Farland), foram semeadas em placas contendo 10 mL de ágar MRS, e incubadas a 37°C por 24 horas, em anaerobiose (Anaerobac, Probac do Brasil). Após a incubação, foram feitos orifícios de 3 mm de diâmetro no ágar a 0,5 cm de distância de cada 'gota' de crescimento e adicionou-se 20 microlitros de solução (20 mg . mL⁻¹) de quatro enzimas, sendo distribuídas cada uma em um orifício. Utilizou-se as enzimas pepsina (de mucosa de estômago suíno), α -quimiotripsina (de pâncreas de bovino), proteinase K (de *Tritirachium album*), e tripsina (de pâncreas de bovino), todas da marca Sigma – Aldrich. Utilizou-se 20 microlitros de água destilada esterilizada como controle negativo. Após 15 minutos em temperatura ambiente, adicionou-se uma sobrecamada de 8 mL de BHI semi-sólido (0,8% de ágar) contendo, aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC . mL⁻¹ (padrão 0,5 de Mc Farland) de *S. mutans*,

incubando-se a 35°C por 24 horas. A natureza protéica da inibição foi confirmada pela sensibilidade da substância produzida a uma ou mais enzimas testadas. Quando a substância mostrou-se sensível as enzimas, ocorreu o crescimento de *S. mutans* onde a enzima foi aplicada, formando um halo em forma de meia lua em volta do isolado. No controle negativo a zona de inibição permanece inalterada.

Utilizou-se como controle positivo a bactéria ácido láctica *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DY13, por ser uma bactéria produtora de bacteriocinas e apresentar sensibilidade comprovada a proteinase K e α -quimiotripsina.

1.3 Escolha das bactérias probióticas com maior potencial de inibição de *S. mutans*

Com base nos resultados obtidos nos testes de atividade antagonista e de confirmação de natureza protéica da inibição das BAL contra *S. mutans*, procedeu-se a escolha de duas das cepas, preferencialmente de gêneros distintos, utilizando como critérios as zonas de inibição com maior diâmetro e a preferência por cepas com sensibilidade a pelo menos uma das enzimas testadas.

2 Culturas Utilizadas

Foram utilizadas duas culturas consideradas probióticas *Lactobacillus brevis* ATCC 367 e *Bifidobacterium lactis* (DELVO PRO LAFTI B94 – Global Food). Foram repicadas em ágar MRS e incubadas durante 18-24 horas a 35°C, antes de serem submetidas aos processos de microencapsulação e liofilização.

3 Produção de biomassa das culturas probióticas

Foram preparados 20 tubos tipo *falcon* com capacidade para 50 mL, contendo 40 mL de caldo MRS. Para cada um dos tubos, foi transferida uma alçada de cultivo probiótico, sendo incubados a 35°C durante 18-24 horas. Após este período foi retirado 1 mL de um dos tubos para a contagem de células viáveis, sendo realizadas diluições seriadas até 10^{-10} . Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a velocidade de 17558,19g em centrífuga, modelo 5430R (marca Eppendorf), refrigerada a 4°C. Os

pelets formados foram lavados duas vezes com água esterilizada estéril, transferindo-se todos os *pelets* formados para um único tubo tipo *falcon*, adicionando-se cerca de 1 mL de solução de leite em pó desnatado esterilizado (concentração de 10%), utilizado como agente crioprotetor, após foi homogeneizado e armazenados a -80°C.

4 Liofilização

Os tubos contendo as biomassas congeladas foram imediatamente levados ao Liofilizador (L101 da marca LIOPOT), sendo submetidas às condições de vácuo. Os produtos foram retirados do liofilizador após 48 horas de processo, sendo que as porções liofilizadas de biomassa formadas foram transferidas todas para um mesmo tubo tipo *falcon*, sendo armazenadas a -18°C.

4.1 Viabilidade após a liofilização

Com a finalidade de certificar a viabilidade das bactérias após o processo de liofilização, cada cultura liofilizada foi reidratada em 100 mL de água destilada estéril, utilizando-se alíquotas de 250 mg de cada uma. Novamente foram realizadas diluições seriadas até 10^{-10} , que foram plaqueadas em ágar MRS e incubadas a 37°C durante 24 horas, em condição de aerobiose, no caso de *L. brevis* e anaerobiose (Anaerobac, Probac do Brasil), no caso de *B. lactis*.

5 Microencapsulação

5.1 Preparação da solução do agente microencapsulante

Em frascos de vidro com capacidade para 200 mL, foram adicionados 100 mL de água destilada, 2% do polímero polivinilpirrolidona (PVP) e 5% de lactose, sendo homogeneizados. Foram submetidos a esterilização em autoclave a 121°C durante 15 minutos, e resfriados até 25°C.

Polivinilpirrolidona (PVP) foi o polímero escolhido como agente encapsulante por apresentar alta solubilidade em água. Quando seco o polímero encontra-se como um pó, de aspecto floculento, que é capaz de absorver quase 20 % de seu peso seco em água.

Quando diluído em água, apresenta a capacidade de formar filmes finos, o que a torna um revestimento interessante em si próprio ou na formulação de revestimentos (POLIVINILPIRROLIDONA, 2013). Já a lactose foi escolhida em função das características de metabolização da bactéria cariogênica estudada, por não ser a fonte principal de fermentação e por, comprovadamente, não acarretar em significativa perda mineral do esmalte do dente (RIBEIRO; RIBEIRO, 2004).

5.2 Processo de microencapsulação

A microencapsulação foi realizada no Laboratório de Nanotecnologia da Universidade Federal do Pampa (Campus Uruguaiana), através do método de atomização, sugerido por Grosso e Fávoro-Trindade (2004).

A biomassa de cultura probiótica foi descongelada até 25°C, retirando-se uma alíquota de 3 mL de cultivo, que foi transferida para um frasco estéril com capacidade para 100 mL. Logo foram adicionados 50 mL de solução contendo os agentes encapsulantes (2% de PVP e 5% de lactose) e procedeu-se a homogeneização da mistura.

A mistura foi conectada ao atomizador através de uma mangueira coletora, sendo submetida ao processo de atomização em Mini *Spray Dryer* BUCHI modelo B-290 (fig. 8), com aspiração a 100% e pressão de bomba de 2 mL/ minuto (20%).



Figura 8 - Mini *Spray Dryer* BUCHI modelo B-290, Laboratório de Nanotecnologia – Universidade Federal do Pampa/ Campus Uruguaiiana.

Fonte: A autora.

5.3 Rendimento da microencapsulação

O rendimento do processo de microencapsulação foi calculado através da equação:

$$R = \frac{m_f \times 100}{(m_{ae} + m_c)}$$

Onde R é o rendimento, expresso em percentual; m_f é a massa, em gramas, do produto final da microencapsulação; m_{ae} é a massa inicial, em gramas, dos agentes encapsulantes; e m_c é a massa inicial, em gramas, de cultura probiótica.

5.4 Viabilidade das bactérias após o processo de microencapsulação

Realizou-se a contagem de células viáveis, a fim de verificar se a exposição das culturas probióticas às condições do processo de atomização não alteram significativamente sua viabilidade. Para tanto, diluiu-se 250 mg do material microencapsulado em 100 mL de água destilada estéril. Foram realizadas diluições seriadas até 10^{-10} , que foram plaqueadas em ágar MRS e incubadas a 37°C durante 24 horas, em condição de aerobiose, no caso de *L. brevis* e anaerobiose (Anaerobac, Probac do Brasil), no caso de *B. lactis*.

6 Microscopia Eletrônica de Varredura

A confirmação da formação das microcápsulas, bem como a análise da morfologia foram realizadas utilizando-se o microscópio eletrônico de varredura Shimadzu modelo SSX-550 (fig. 9), no Laboratório de Microscopia, pertencente ao Centro de Microscopia, localizado na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas. Realizou-se o esfregado do cultivo das células novas (após 18 – 24 horas de incubação em MRS a 37°C) nos próprios suportes, os quais foram secos em estufa a 40°C durante 12 horas após, as amostras foram fixadas em suporte metálico e recobertas com uma fina camada de ouro. A visualização foi realizada em aumentos de 500 a 15000 vezes, com voltagem de excitação de 10 a 15 kV. As culturas probióticas não microencapsuladas também tiveram sua morfologia analisada, procedendo-se, de igual maneira que para o material microencapsulado.



Figura 9 - Microscópio Eletrônico de Varredura Shimadzu modelo SSX-550 do Laboratório de Microscopia, pertencente ao Centro de Microscopia, localizado na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas.

Fonte: A autora.

7 Goma de mascar

A goma de mascar utilizada neste estudo foi adquirida da empresa KERVAN GIDA SANAYI VE TICARET A.S. - Turquia, apresentando 1 cm de largura e 180 cm de comprimento (50g).

Apresenta em sua composição: sacarose, dextrose, acidificante, plastificante (glicerina), corante (E171), emulsificante (lecitina de soja) e antioxidante (BHT).

A goma foi fracionada em porções contendo 0,95g (Fig. 10) em condições de esterilidade.

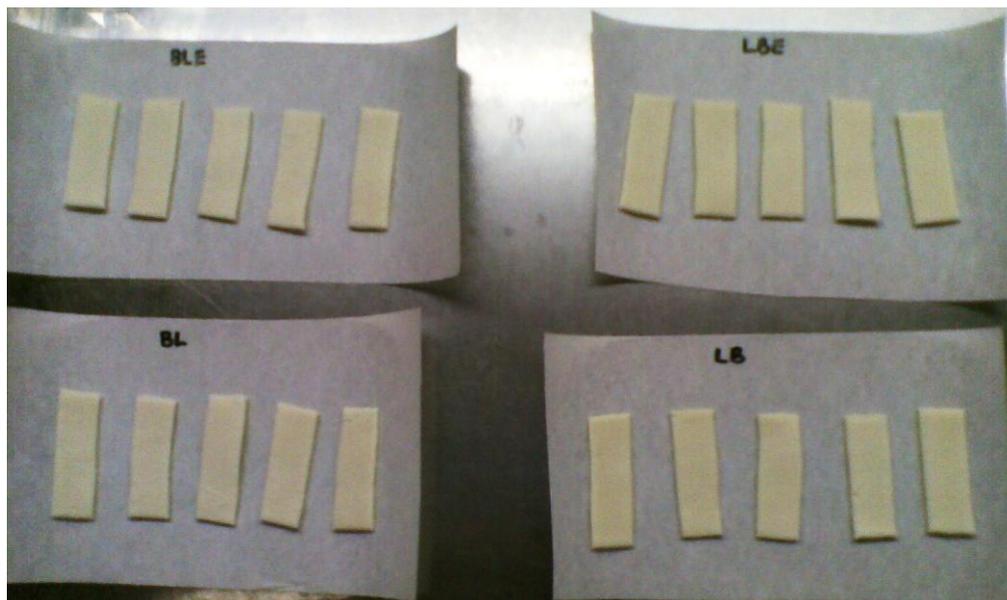


Figura 10 - Gomas de mascar contendo 0,95 g, a serem utilizadas para a aplicação de *B. lactis* microencapsulada (BLE) e liofilizada (BL), e *L. brevis* microencapsulada (LBE) e liofilizada (LB).

8 Estudo da viabilidade das bactérias probióticas microencapsuladas e não microencapsuladas na goma de mascar

8.1 Aplicação das bactérias na goma de mascar

Tanto para a aplicação de bactérias liofilizadas quanto microencapsuladas, foi pesado em balança analítica, respeitando condições de esterilidade, 0,05g de cultura, submetendo-se a massa conhecida ao contato direto com a superfície de cada goma (0,95g), de forma a obter-se uma distribuição homogênea em ambos os lados da goma. Cada produto final (goma + bactérias) assumiu o peso total de 1g.

O estudo em questão contou com 4 tratamentos definidos como:

“BLE” – Goma de mascar acrescida de *Bifidobacterium lactis* microencapsulada;

“BL” – Goma de mascar acrescida de *Bifidobacterium lactis* liofilizada;

“LBE” - Goma de mascar acrescida de *Lactobacillus brevis* microencapsulada;

“LB” - Goma de mascar acrescida de *Lactobacillus brevis* liofilizada.

Para cada tratamento realizou-se a aplicação das bactérias nas frações da goma de mascar em triplicata, totalizando 15 frações por tratamento, a serem analisadas em 5 diferentes períodos de armazenamento.

8.2 Condições de armazenamento

8.2.1 Embalagem

O papel couché é um papel base, que recebe uma camada de revestimento, composto por caulim, carbonato de cálcio, látex e alguns aditivos. Para gomas de mascar comumente utiliza-se papel couché monolúcido, pois apresenta revestimento couché brilhante em um lado e é liso no verso para evitar impermeabilidade no contacto com a água ou umidade (GLOSSÁRIO PAPEL, 2013). Já a folha de alumínio cumpre a função de barrar fatores externos que causam deterioração, como o oxigênio, a umidade, a luz e microorganismos. É um material atóxico, não-absorvente, anticorrosivo, e é inodoro não permitindo a saída de odores internos, nem a entrada de odores externos. Além disso, por estar livre de eletricidade estática, a folha de alumínio não é impregnada de poeira e resíduos no manuseio (GUIA DO ALUMÍNIO, 2013).

Para as amostras dos 4 tratamentos utilizou-se embalagem primária de papel couché de baixa gramatura e embalagem secundária de folha de alumínio com 20 µm de espessura, selados com adesivo. As gomas de mascar contendo as culturas probióticas foram embaladas e armazenadas à temperatura ambiente.

8.3 Contagem de células viáveis durante o armazenamento

Os 4 tratamentos, em triplicata, foram analisados em 5 períodos distintos de armazenamento: T1 (dia 1), T2 (dia 9), T3 (dia 17), T4 (dia 25) e T5 (dia 33).

Cada goma de mascar de 1g foi homogeneizada em 9 mL de água peptonada 0,1% e foram realizadas diluições seriadas até 10^{-9} , que foram plaqueadas em ágar MRS e incubadas a 37°C durante 48 horas, em condição de aerobiose, no caso de *L. brevis* e anaerobiose (Anaerobac, Probac do Brasil), no caso de *B. lactis*.

8.3.1 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística através da verificação da normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk, análise de variância e teste de médias, através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$), comparando a viabilidade das bactérias

probióticas em cada tratamento com o passar dos dias de armazenamento, e em cada período de armazenamento a contagem observada para cada tratamento, utilizando-se o softwer SAS 9.2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 Atividade antagonista

1.1 Definição da concentração de clorexidina a ser utilizada como controle

Todas as concentrações de clorexidina mostraram-se eficientes para inibição de *S. mutans*. Os resultados da média dos tamanhos dos halos formados pode ser observada na tabela 2.

Tabela 2 - Média do tamanho dos halos de inibição (mm) das diferentes concentrações de clorexidina contra *S. mutans*.

Clorexidina	Halo (mm)
2%	20,33 ^a
0,2%	18,33 ^{ab}
0,12%	17,00 ^b

1/ Médias acompanhadas por letra minúscula diferente na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey($p \leq 0,05$) comparando o tamanho dos halos para as diferentes concentrações de clorexidina.

Através dos resultados obtidos foi possível comprovar estatisticamente que a clorexidina com concentração de 2%, encontrada nas formulações comerciais, comparada à clorexidina com concentração de 0,12%, padrão brasileiro, apresentaram diferença significativa entre si. Já a concentração de 0,2%, padrão europeu, não diferiu significativamente de nenhuma das concentrações testadas.

Levando em consideração que as formulações comerciais são consideradas concentradas, ou seja, os fabricantes recomendam que sejam diluídas para utilização, e que a concentração de 0,12%, embora não apresente diferença significativa da concentração de 0,2%, apresentou um diâmetro médio de halo inferior às demais concentrações testadas, optou-se por utilizar o padrão europeu (0,2%) como padrão deste estudo, com a finalidade de utilizar um padrão mais rigoroso de comparação com os halos de inibição obtidos pelos micro-organismos probióticos frente à bactéria cariogênica.

1.2 Atividade antagonista de bactérias ácido láticas contra *S. mutans*

Todas as BAL testadas apresentaram atividade antagonista contra a bactéria cariogênica. Na Tabela 3 confirma-se os diâmetros das zonas de inibição obtidos para cada micro-organismo testado.

Tabela 3 - Média do diâmetro das zonas de inibição (mm) do controle (clorexidina) e das BAL contra *S. mutans*.

Agente Antagonista	Diâmetro da zona de inibição (mm)
Controle (clorexidina 0,2%)	18,33 ^a
<i>L. brevis</i>	18,33 ^{aA}
<i>L. delbruekii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	16,33 ^{aA}
<i>B. bifidum</i>	12,00 ^{bB}
<i>B. lactis</i>	15,00 ^{aAB}

1/ Médias acompanhadas por letra minúscula diferente na coluna diferem entre si pelo teste de Dunnet ($p \leq 0,05$) comparando o diâmetro da zona de inibição das BAL com o do controle (clorexidina). Médias acompanhadas por letra maiúscula diferente na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando o diâmetro da zona de inibição das BAL entre si.

Comparando as zonas de inibição obtidas pelas BAL entre si é possível observar que a *B. bifidum* apresentou diâmetro significativamente inferior ao obtido por *L. brevis* e *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus*. O diâmetro apresentado por *B. lactis* não diferiu significativamente de nenhuma das BAL testadas, embora apresente zona de inibição inferior às obtidas por bactérias do gênero *Lactobacillus*, apresentou o maior diâmetro entre as bactérias do gênero *Bifidobacterium* testadas.

Quando utiliza-se o diâmetro obtido pela clorexidina como controle de inibição, apenas a zona de inibição obtida por *B. bifidum* apresentou valor significativamente inferior ao controle positivo e às demais BAL testadas. Todas as demais bactérias não apresentaram diferença significativa do diâmetro das zonas de inibição quando comparadas entre si, nem quando comparadas com o controle, destacando-se que o *L. brevis* apresentou a mesma eficiência de atividade antagonista da clorexidina. Desta forma, exceto a *B. bifidum*, todas as demais bactérias apresentam potencial de inibição significativo contra *S. mutans*.

Estudos *in vivo* realizados por Petti et al. (2001) apresentaram resultados similares à presente pesquisa, mostrando que um iogurte contendo *L. bulgaricus*

ingerido durante 8 meses por um determinado grupo de pessoas, provocou a redução de *S. mutans* na cavidade oral. Aloha et al. (2002) observaram grande diminuição de *S. mutans* nos níveis salivares após a administração de queijo contendo *L. rhamnosus*, por um curto período de tempo. Çaglar et al. (2008) também verificaram a diminuição de *S. mutans* nos níveis salivares após ministrar, por curto período de tempo, pastilhas contendo *L. reuteri*.

Desta maneira, é possível inferir que, uma vez comprovada a atividade antagonista significativa de BAL contra bactérias cariogênicas, como é o caso do *S. mutans*, surge uma nova perspectiva de pesquisa, levantando-se a hipótese de que estas bactérias quando aplicadas em alimentos, ministrados com frequência em quantidades adequadas, podem atuar benéficamente sobre a microbiota da cavidade oral, retardando o processo de formação de cáries.

1.3 Confirmação da atividade bacteriocinogênica

Considerando que todas as BAL testadas apresentaram atividade antagonista frente à *S. mutans*, todas foram submetidas à verificação da natureza protéica da atividade antagonista. Segundo Moraes et al. (2010) este teste deve ser realizado com o intuito de verificar a natureza da(s) substância(s) responsável(is) pela inibição através da utilização de enzimas proteolíticas. Uma vez que seja verificada sensibilidade da substância antimicrobiana a uma protease, é possível inferir que a natureza da inibição é protéica. Desta maneira sabe-se que a bactéria produz o composto denominado bacteriocina.

Todas as bactérias testadas apresentaram sensibilidade a pelo menos uma das proteases testadas. A tabela 4 apresenta os resultados obtidos no teste de verificação da natureza protéica da atividade antagonista das BAL frente à *S. mutans*.

Tabela 4 - Verificação da natureza da atividade antagonista das BAL e do controle positivo (*Lactococcus lactis*) através da sensibilidade às enzimas proteolíticas (pepsina, α -quimiotripsina, proteinase K e tripsina).

BAL	Pepsina	α -quimiotripsina	Proteinase K	Tripsina
<i>Lactococcus lactis</i>	-	+	+	-
<i>L. brevis</i>	-	+	+	+
<i>L. delbruekii</i> subsp.	-	+	-	+
<i>Bulgaricus</i>				
<i>B. bifidum</i>	-	+	-	-
<i>B. lactis</i>	-	+	+	+

Através dos resultados obtidos é possível inferir que todas as bactérias testadas no presente estudo são produtoras de bacteriocinas, e que estas sozinhas ou em conjunto com outras substâncias de natureza não-protéica produzidas pelas cepas acarretam na atividade inibitória da bactéria cariogênica. 100% (4) das BAL testadas apresentaram resistência a pepsina, 100% (4) demonstrou sensibilidade a α -quimiotripsina, 50% (2) mostrou-se sensível a proteinase K e 75% (3) a tripsina. Arauz et al. (2009) sugere que a verificação de sensibilidade a mais de uma enzima proteolítica indica a produção de mais uma bacteriocina pela cepa testada, exaltando a necessidade da utilização de várias proteases ao realizar o teste de verificação de natureza protéica do antagonismo, visto que cada bacteriocina, em função dos diferentes peptídeos que compõem sua estrutura, apresenta sensibilidade a proteases específicas.

Ortolani (2009) testou a sensibilidade a enzimas proteolíticas de 58 bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo Minas frescal com atividade antagonista contra *Listeria monocytogenes*, onde 3 isolados não propiciaram a observação de sensibilidade a nenhuma enzima e todos os demais 55 isolados apresentaram sensibilidade a pelo menos uma das proteases testadas e 100% de resistência a pepsina, o que vai de encontro ao presente estudo. Estudos realizados por Schittler (2012) confirmaram atividade antagonista anti-*Listeria* de natureza protéica de 28 BAL isoladas de leite in natura da região oeste de Santa Catarina.

Estudos realizados por Tukel et al. (2007) propiciaram comprovar que a cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MC 38 é produtora de bacteriocina, através da verificação de sensibilidade a α -quimiotripsina e proteinase K. Já Marguet et al. (2011)

virificaram atividade antagonista de isolados identificados como *Enterococcus mundtii* Tw 56 e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Tw 34 contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ou *L. innocua* ATCC 33090, observando sensibilidade a tripsina e resistência a lisozima, lipase e catalase de ambas as bactérias testadas.

Levando em consideração que todas as bactérias testadas, no presente estudo, apresentaram atividade antagonista e sensibilidade a pelo menos uma das enzimas proteolíticas testadas, confirmando produção de bacteriocina e sua influência na inibição de *S. mutans*, optou-se pela escolha de duas bactérias, sendo uma do gênero *Lactobacillus* e uma do gênero *Bifidobacterium*, utilizando-se como critério os maiores diâmetros das zonas de inibição. Desta maneira, as cepas de *L. brevis* e *B. lactis* foram escolhidas por apresentarem significativo potencial de inibição contra *S. mutans*. A figura 11 permite a visualização das zonas de inibição formadas pelas bactérias escolhidas em comparação com o controle positivo (clorexidina 0,2%).

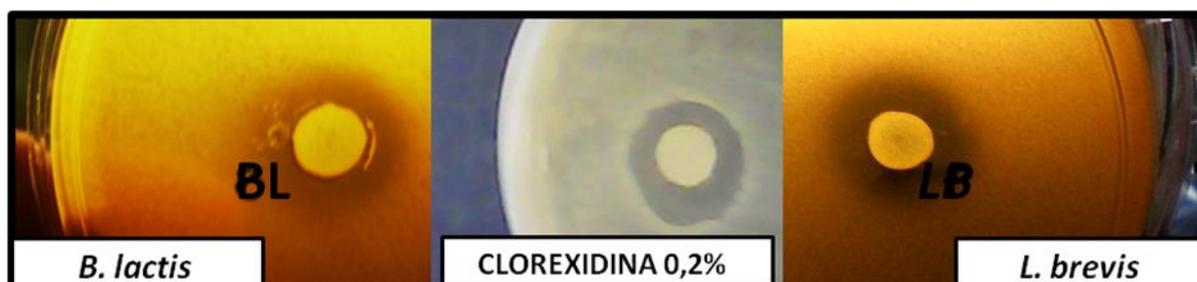


Figura 11 - Zonas de inibição contra *S. mutans* formadas por *B. lactis* (≈ 15 mm), clorexidina 0,2% (anti-séptico bucal) ($\approx 18,33$ mm) e *L. brevis* ($\approx 18,33$ mm).

A opção por trabalhar *L. brevis* e *B. lactis* é particularmente interessante, uma vez que se tratam de bactérias potencialmente probióticas. Além de poder acarretar na inibição de *S. mutans*, que possivelmente contribuirá com a diminuição da microbiota cariogênica na cavidade bucal, essas bactérias são capazes de propiciar outros efeitos benéficos à saúde.

2 Viabilidade das culturas após a liofilização

Após serem submetidas ao processo de liofilização, a contagem de células viáveis das bactérias probióticas demonstrou que o processo não altera

significativamente a viabilidade de *L. brevis* nem de *B. lactis*, como pode ser observado na tabela 5.

Tabela 5 - Média da contagem de células viáveis de *L. brevis* e *B. lactis* antes e após o processo de liofilização.

Bactérias Probióticas	Contagem antes da liofilização (Log UFC . mL⁻¹)	Contagem após a liofilização (Log UFC . mL⁻¹)
<i>L. brevis</i>	9,16 ^a	9,16 ^a
<i>B. lactis</i>	9,60 ^a	9,57 ^a

1/ Médias acompanhadas por letra minúscula diferente na coluna diferem entre si pelo teste T ($p \leq 0,05$) comparando a viabilidade de cada uma das bactérias antes e após o processo de liofilização.

No caso de *L. brevis* a contagem manteve-se idêntica à contagem inicial, enquanto *B. lactis* apresentou uma variação extremamente pequena na contagem de células viáveis, não havendo diferença significativa. Isto demonstra que o processo não afeta a viabilidade de nenhuma das bactérias probióticas submetidas a tais condições.

De maneira geral, a liofilização é amplamente utilizada para a conservação de micro-organismos, embora uma minoria não apresente bons resultados perante o processo. Tal fato pode ser observado através dos resultados obtidos na pesquisa realizada por Farias e Magalhães (2009), que avaliaram a viabilidade de 18 culturas pertencentes ao gênero *Geotrichum* após o processo de liofilização e verificaram a inviabilidade de 4 delas, em contraponto às outras 14 que mantiveram-se viáveis.

3 Microencapsulação

As cepas de *L. brevis* e *B. lactis* foram submetidas ao processo de microencapsulação através de atomização, utilizando solução com 2% de polivinipirrolidona e 5% de lactose como agente encapsulante. Para tanto, foram produzidas biomassas de ambas as bactérias, apresentando após 18-24 horas de incubação a 35°C uma contagem de células viáveis equivalente a 9,38 Log UFC . mL⁻¹ para *L. brevis* e 9,26 Log UFC . mL⁻¹ para *B. lactis*.

Por se tratar de diferentes cepas bacterianas, foi possível observar diferenças nas variáveis durante o processo de microencapsulação:

- *L. brevis*

Temperatura de entrada da solução: 90°C

Temperatura de saída (material microencapsulado): 50°C

Pressão da bomba: 2 mL . min.⁻¹

Aspiração: 100%

Massa de polivinilpirrolidona: 1,046 g

Massa de lactose: 4,997 g

Massa de cultura bacteriana: 3,00g

Volume de água: 50 mL

Massa final (material microencapsulado): 2,17 g

- *B. lactis*

Temperatura de entrada da solução: 90°C

Temperatura de saída (material microencapsulado): 64°C

Pressão da bomba: 2 mL . min.⁻¹

Aspiração: 100%

Massa de polivinilpirrolidona: 1,065g

Massa de lactose: 4,998 g

Massa de cultura bacteriana: 3,00g

Volume de água: 50 mL

Massa final (material microencapsulado): 2,34 g

Ao final do processo de microencapsulação obteve-se um produto branco, inodoro na forma de pó extremamente fino (Fig. 12).



Figura 12 - Produto final da microencapsulação por atomização de *L. brevis* e *B. lactis* utilizando solução de 2% de polivinipirrolidona e 5% de lactose como agente encapsulante.

Fonte: A autora.

3.1 Rendimento da microencapsulação

A massa do produto final da microencapsulação para cada 50 mL de solução (agentes encapsulantes + biomassa bacteriana) de *L. brevis* foi de 2,17 g, enquanto de *B. lactis* foi de 2,34 g. A partir desses valores foi possível calcular o percentual de rendimento do processo para cada uma das cepas probióticas.

- *L. brevis*

$$R = \frac{2,17 \text{ g} \times 100}{(1,046 \text{ g} + 4,997 \text{ g}) + 3,00 \text{ g}} = 23,996\% = 24\%$$

- *B. lactis*

$$R = \frac{2,34 \text{ g} \times 100}{(1,065 \text{ g} + 4,998 \text{ g}) + 3,00 \text{ g}} = 25,819\% = 25,8\%$$

Embora tenha sido observado um rendimento maior do processo para *B. lactis* (25,8%) quando comparado a *L. brevis* (24%), é possível verificar uma diferença

consideravelmente pequena entre as bactérias, correspondendo a 1,8% de rendimento a mais no caso de *B. lactis*.

Rapacci e Dellani (2006) realizaram o processo de microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* (La-5), *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus* subsp. *bulgaricus* (YC-X11), *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (ABT-4), com goma acácia pelo processo de atomização, verificando percentuais de rendimento da microencapsulação que variaram de 2,43% a 4,70%, valores estes, bastante inferiores aos obtidos neste estudo.

Hamim Neto (2012) avaliou o percentual de rendimento do processo de microencapsulação por atomização da peptidase produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, em fermentação em estado sólido, variando condições de processo que incluem vazão de alimentação, proporção de extrato bruto/ adjuvante e temperatura, encontrando valores de rendimento superiores aos encontrados no presente estudo, variando de 32,58% a 66,12%.

3.2 Viabilidade das bactérias após o processo de microencapsulação

Após o processo de microencapsulação pelo método de atomização as bactérias probióticas apresentaram contagem de células viáveis de 9,36 Log UFC . mL⁻¹ para *L. brevis* e 9,18 Log UFC . mL⁻¹ para *B. lactis*, não apresentando diferença significativa, como pode ser observado na tabela 6.

Tabela 6 - Média da contagem de células viáveis de *L.brevis* e *B. lactis* antes e após o processo de microencapsulação pelo processo de atomização.

Bactérias Probióticas	Contagem antes da microencapsulação (Log UFC . mL⁻¹)	Contagem após a microencapsulação (Log UFC . mL⁻¹)
<i>L. brevis</i>	9,38 ^a	9,36 ^a
<i>B. lactis</i>	9,26 ^a	9,18 ^a

1/ Médias acompanhadas por letra minúscula diferente na coluna diferem entre si pelo teste T ($p \leq 0,05$) comparando a viabilidade de cada uma das bactérias antes e após o processo de microencapsulação .

Diante de tais resultados, verificou-se que o processo de atomização pode ser utilizado para a microencapsulação destas bactérias probióticas, haja vista que sua viabilidade não é alterada durante o processo. Villena et al. (2009) cita que além de ser um processo simples, a atomização é apropriada para a microencapsulação de materiais e micro-organismos termosensíveis, em função do curto período de tempo em que são expostos a temperaturas elevadas.

Estudos realizados por ZHAO et al. (2008), demonstram resultados contrários a este estudo, visto que após a microencapsulação de *L. acidophilus* por atomização com β -ciclodextrina e goma acácia, observaram a redução de 1,2 a 2,4 Log na viabilidade do micro-organismo. Este resultado pode se dever ao fato de que existem grandes variações quanto à habilidade de sobrevivência de diferentes gêneros e espécies bacterianas ao processo (GOLOWCZYC et al., 2010).

Castro-Cislaghi et al. (2012) realizaram a microencapsulação de *Bifidobacterium* Bb-12 pelo mesmo método, utilizando como agentes encapsulantes goma arábica e soro de leite, separadamente, obtendo resultados que diferem do presente trabalho. Antes do processo a contagem de células viáveis girava em torno de 10,13 Log UFC g⁻¹, quando utilizaram goma arábica como agente encapsulante, e 10,28 Log UFC g⁻¹, no caso da utilização de soro de leite. Após o processo, os autores verificaram um declínio significativo na viabilidade de aproximadamente 1,62 Log UFC g⁻¹ e 0,94 Log UFC g⁻¹, quando microencapsulados com goma arábica e soro de leite, respectivamente, comprovado estatisticamente pelo teste de Tukey (p \leq 0,05). SUNNY-ROBERTS e KNORR (2009) sugerem que a viabilidade de bactérias microencapsuladas por atomização é diretamente influenciada pelo agente encapsulante utilizado.

4 Microscopia Eletrônica de Varredura

Segundo Wang et al. (2011) a microscopia eletrônica de varredura é um método qualitativo eficiente para a confirmação da microencapsulação de uma substância ou de um micro-organismo, que permite uma análise rápida e direta da eficiência do processo. Através desta técnica é possível levantar informações sobre as características morfológicas das microcápsulas, como formato e tamanho do material formado, além da presença de poros e fissuras.

Foi possível observar a formação das microcápsulas para ambas as bactérias submetidas ao processo de atomização (fig. 13 B e C; fig. 14 B e C). Em ambos os casos verificou-se a formação de produtos de forma arredondada, com superfície desuniforme e aspecto enrugado, com tamanhos variáveis de 1µm a 15µm. Considerando que bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* apresentam tamanho que pode variar entre 2 e 8 µm (OLMOS, 2006; SOLANO-AGUILAR et al., 2008) e pertencentes ao gênero *Lactobacillus* variam entre 0,7 e 4 µm (AXELSON, 1998) é possível que algumas das microcápsulas formadas não contenham em seu interior células bacterianas, uma vez que podem apresentar tamanho inferior ao de uma célula não microencapsulada. Não foram observados poros nem fissuras nas microcápsulas formadas em nenhum dos casos.

Resultados bastante parecidos foram obtidos por Oliveira (2006) ao avaliar a morfologia das microcápsulas contendo *L. acidophilus* e *B. lactis*, obtidas por coacervação e secas em atomizador, utilizando pectina e caseína como agentes encapsulantes, as quais apresentaram formato arredondado, com concavidades, sem poros ou rachaduras, e paredes contínuas, porém rugosas.

Microesferas com características em comum foram encontradas por Müller (2011) ao analisar os aspectos morfológicos, obtidos por MEV, das microesferas com óleo essencial de laranja, de amido modificado e maltodextrina encapsulados por atomização, observando ausência de fissuras, indicando a formação de um filme contínuo na parede externa das microesferas, e tamanho em torno de 15µm.

Assim como as microcápsulas as células bacterianas, em ambos os casos, apresentaram-se em diferentes tamanhos, verificando-se maior uniformidade para *L. brevis* (Fig. 13 A), quando comparadas às células de *B. lactis* (Fig. 14 A).

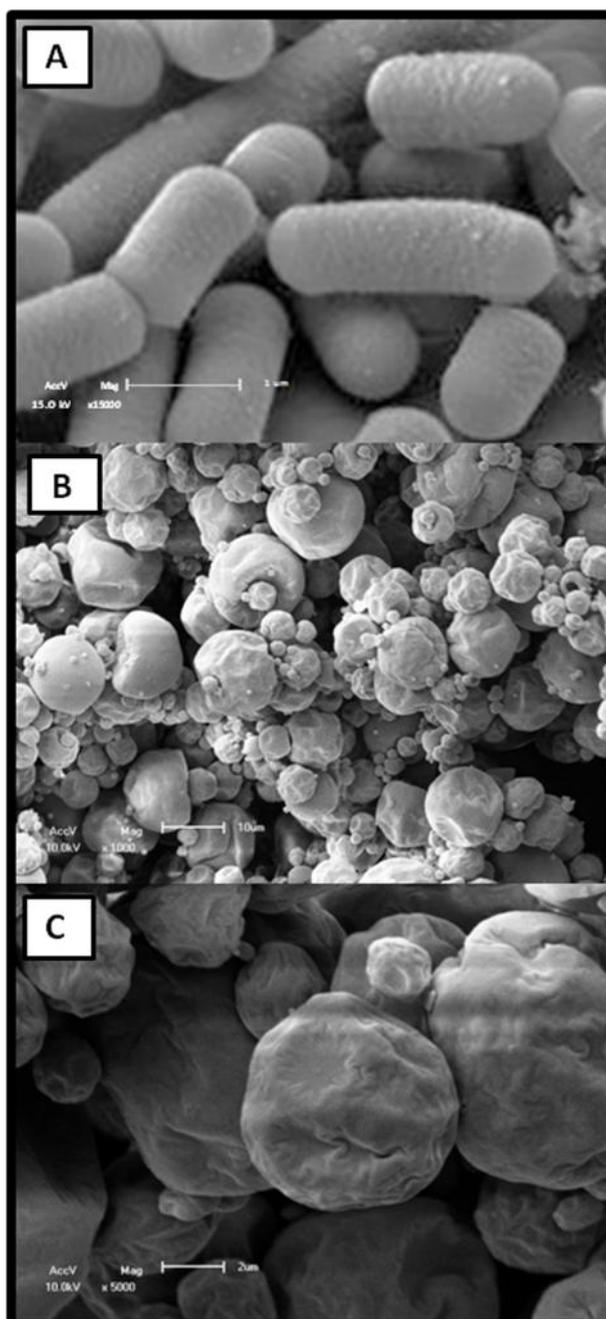


Figura 13 - Micrografias de MEV (Laboratório de Microscopia/Centro de Microscopia/Faculdade de Odontologia/ UFPel.) de *L. brevis* antes e após microencapsulação por atomização com polivinilpirrolidona e lactose como agentes encapsulantes: A (x 10000) – células livres (não microencapsuladas); B (x 1000) e C (x 5000) – microcápsulas.

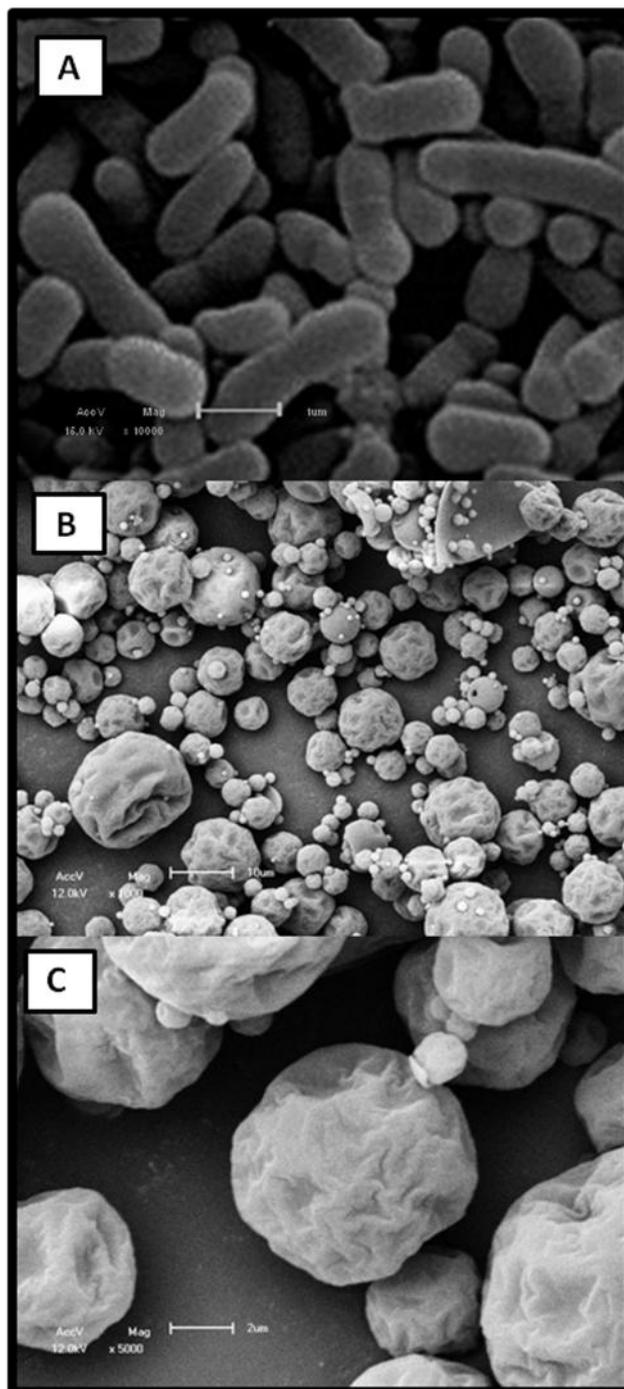


Figura 14: Micrografias de MEV (Laboratório de Microscopia/Centro de Microscopia/Faculdade de Odontologia/ UFPel.) de *B. lactis* antes e após microencapsulação por atomização com pvp e lactose como agentes encapsulantes: A (x 10000) – células livres (não microencapsuladas); B (x 1000) e C (x 5000) – microcápsulas.

5 Estudo da viabilidade das bactérias probióticas microencapsuladas e não microencapsuladas na goma de mascar

As bactérias probióticas submetidas ao processo de microencapsulação demonstraram comportamento bastante semelhante, em relação à viabilidade das células com o passar do período de armazenamento. Já as bactérias aplicadas na goma na forma livre demonstraram diferença de comportamento, podendo-se observar através dos resultados apresentados na tabela 7. Todos os tratamentos foram analisados em 5 diferentes períodos, a cada 8 dias, totalizando 33 dias de armazenamento.

Tabela 7 - Médias das contagens de células viáveis de *B. lactis* microencapsulada (BLE) e livre (BL) e *L.brevis* microencapsulada (LBE) e livre (LB) durante o período de armazenamento de 33 dias, analisada em 5 tempos distintos.

	Contagem BLE (Log UFC.mL⁻¹)	Contagem BL (Log UFC.mL⁻¹)	Contagem LBE (Log UFC.mL⁻¹)	Contagem LB (Log UFC.mL⁻¹)
T1 (dia 1)	9,18bA	9,57aA	9,36bA	9,16bA
T2 (dia 9)	8,36cB	2,0dB	8,91aB	8,62bB
T3 (dia 17)	8,37aB	1,15bB	8,73aBC	8,65aB
T4 (dia 25)	8,27cB	< 1,0dB	8,76aBC	8,64bB
T5 (dia 33)	8,19aB	< 1,0bB	8,45aC	8,56aB

1/ Médias acompanhadas por letra minúscula diferente na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando dentro de cada tempo a contagem de células viáveis obtida em cada tratamento. Médias acompanhadas por letra maiúscula diferente na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando dentro de cada tratamento a contagem de células viáveis no decorrer do período de armazenamento.

Para *B. lactis* aplicada microencapsulada na goma de mascar, observou-se um declínio significativo na viabilidade das células entre os dias 1 e 9, verificando-se a diminuição de quase 1 ciclo logarítmico dentro desse período. Esta diferença não foi verificada nos demais tempos analisados, visto que a viabilidade se manteve estável, atingindo o 33º dia com contagem média de 8,19 Log UFC . mL⁻¹. Comportamento semelhante foi observado no caso de *L. brevis* microencapsulada, onde foi verificado também uma queda significativa da viabilidade dentro do período que envolve os 2 primeiros tempos de análise. Neste caso, apenas a contagem obtida no T5 mostrou-se significativamente inferior aos períodos T1 e T2. Os valores encontrados em T3 e T4

mostraram-se significativamente menores quando comparados a T1, porém não apresentaram diferença quando comparados a T2 e T5. Apesar das variações na viabilidade apresentadas pelas bactérias probióticas microencapsuladas, ambas atingiram os 33 dias de armazenamento com contagens superiores a $8 \text{ Log UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$, sendo esta uma viabilidade elevada e desejável em se tratando de alimentos probióticos. Este fato, permite inferir que os agentes encapsulantes utilizados, bem como o processo de microencapsulação utilizados, mostraram-se adequados para a manutenção da viabilidade tanto de *L. brevis* quanto *B. lactis*.

No caso de *B. lactis* aplicada sem o processo de microencapsulação, ou seja, liofilizada, na goma de mascar, verificou-se um declínio quase total da viabilidade das bactérias. Logo nos primeiros dias de armazenamento foi observado um declínio significativo, superior a 6 ciclos logarítmicos. Embora não tenha apresentado diferença significativa, a viabilidade continuou a diminuir dentro de todos os períodos de armazenamento, atingindo os 33 dias com contagem $< 1,0 \text{ Log UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$. Com isso, nota-se que a bactéria aplicada na forma livre não apresenta capacidade de resistir às condições da goma de mascar, sendo eficiente sua microencapsulação quando desejar-se aplicá-la neste tipo de produto, visando sua atividade probiótica. Segundo Homayouni et al. (2008), de maneira geral, células bacterianas protegidas por microencapsulas levam tempo maior para apresentar diminuição substancial da viabilidade quando expostas as diferentes condições.

Quando aplicado na forma livre na goma, *L. brevis* apresenta comportamento diferente significativamente de *B. lactis*. Embora também tenha sido observada uma diminuição significativa da viabilidade entre o 1º e o 9º dia de armazenamento, esta queda mostrou-se inferior a 1 ciclo logarítmico, e a contagem de células viáveis manteve-se estável nos demais tempos analisados, apresentando a maior contagem final entre todos os tratamentos testados, embora não seja verificada diferença significativa quando comparada a BLE e LBE.

Dentro de cada tempo analisado foram verificadas diferenças de contagens entre os tratamentos, destacando-se que *B. lactis* livre apresentou contagem significativamente superior aos demais tratamentos em T1, e a partir de T2 decaiu significativamente, mantendo-se sempre inferior aos demais tratamentos, até T5. As bactérias microencapsuladas, bem como *L. brevis* aplicados na forma livre não apresentaram diferença significativa na contagem final, demonstrando viabilidade

satisfatória, dentro do período de armazenamento estudado, para aplicação em goma de mascar.

Levando em consideração que a contagem final de LBE e LB não diferiu significativamente, pode-se inferir que para a aplicação em goma de mascar, a ser consumida dentro do período de 33 dias, não se faz necessária a microencapsulação de *L. brevis*, haja vista que a utilização de agentes encapsulantes em conjunto com o processo de microencapsulação representam custos, considerados desnecessários quando objetivam manter a viabilidade da bactéria.

Estudos realizados por Grosso e Fávaro-Trindade (2004) avaliaram a estabilidade de *Bifidobacterium lactis* (Bb-12) e de *Lactobacillus acidophilus* (La-05) nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio, em leite e leite acidificado, e a estabilidade de *B. lactis* imobilizado em iogurte, durante 28 dias de estocagem refrigerada. Diferente do presente estudo, os autores observaram uma taxa de sobrevivência adequada de *B. lactis*, tanto na forma livre quanto imobilizada, havendo a redução de apenas 1 ciclo logarítmico após 21 dias de estocagem refrigerada, observando o mesmo comportamento em *Lactobacillus acidophilus*. Além disso, o número de células viáveis de *B. lactis* imobilizado mostrou um declínio gradual durante o período de armazenamento do iogurte. Estes resultados demonstram que a *B. lactis* apresenta comportamentos variáveis dependendo do alimento em que for aplicada. A menor viabilidade verificada no caso da bactéria imobilizada pode ter sido resultante de um ou mais fatores, como o processo de microencapsulação utilizado, o agente encapsulante ou até mesmo a alguma reação das cápsulas com alguma substância presente no alimento. O mesmo não foi observado para *L. brevis*, caso em que a microencapsulação não atua como uma solução da manutenção da viabilidade do micro-organismo.

Já Lorenz (2009) realizou a microencapsulação de *L. acidophilus* (LA-5) pelos métodos de atomização e emulsificação, estudando a viabilidade da bactéria aplicada em sorvete na forma livre e comparando com as microcápsulas obtidas por diferentes processos. Nesse caso, a microencapsulação melhorou significativamente a sobrevivência da bactéria probiótica, quando comparada com a bactéria livre, após 12 semanas de estocagem dos sorvetes a $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$. O que vai de encontro aos resultados obtidos para *B. lactis* neste estudo, quando aplicadas em goma de mascar.

Um fator importante que contribui para a manutenção da viabilidade das células no alimento é a utilização de embalagem adequada visto que objetiva proteger o

alimento das condições externas do ambiente. Desta maneira, é possível que a utilização de embalagem primária (papel couché) e secundária (folha de alumínio) podem ter influenciado positivamente os resultados obtidos neste estudo. A figura 15 apresenta as gomas de mascar utilizadas neste estudo, devidamente embaladas e identificadas.



Figura 15 - Gomas de mascar com a aplicação de *B. lactis* microencapsulada (BLE) e liofilizada (BL), e *L. brevis* microencapsulada (LBE) e liofilizada (LB), embaladas com papel couché e folha de alumínio, fechadas com adesivo.

Em função das elevadas contagens de células viáveis de *B. lactis* microencapsulada e *L. brevis* livre quanto microencapsulada durante o período de armazenamento, verificou-se que a goma de mascar é um veículo passível de aplicação de bactérias probióticas, possibilitando a manutenção das condições necessárias para que as mesmas possam desempenhar papel funcional, quando ingeridas.

CONCLUSÃO

Através da pesquisa realizada, foi possível concluir:

- *L. brevis* ATCC 367 e *B. lactis* (DELVO PRO LAFTI B94 – Global Food) são bactérias probióticas produtoras de bacteriocinas que apresentam a capacidade de inibição *in vitro* de *S. mutans* UA 159 (ATCC 700610) comparável ao anti-séptico bucal clorexidina 0,2%.

A microencapsulação por atomização, utilizando polivinilpirrolidona e lactose como agentes encapsulantes, de *L. brevis* ATCC 367 e *B. lactis* (DELVO PRO LAFTI B94 – Global Food) é eficiente visto que a formação das microcápsulas pôde ser comprovada através da MEV e o processo não alterou a viabilidade das bactérias, mantendo-as com contagens superiores a 8 Log UFC . mL⁻¹ durante 33 dias de armazenamento, quando aplicadas em goma de mascar.

L. brevis ATCC 367 aplicada em goma de mascar na forma livre apresentou-se viável dentro do prazo de 33 dias. Já *B. lactis* (DELVO PRO LAFTI B94 – Global Food), quando submetida às mesmas condições, apresentou declínio significativo da viabilidade nos primeiros 9 dias de armazenamento, o que demonstra a necessidade da microencapsulação quando objetiva-se aplicar em goma de mascar.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo obteve resultados que facilitarão pesquisas posteriores, levantando a possibilidade da realização de estudos *in vivo* que visem verificar se *L. brevis* ou *B. lactis* em goma de mascar é capaz de inibir *S. mutans* na cavidade oral.

REFERÊNCIAS

ACTIMEL. Disponível em: <www.actimel.com.br>. Acesso em 28 de agosto de 2012.

ACTIVIA. Disponível em: <www.activiadanone.com.br>. Acesso em 28 de agosto de 2012.

AHOLA, A. J., YLI-KNUUTTILA, H., SUOMALAINEN, T. *et al.* Shortterm consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. **Arch Oral Biol.** vol. 47, n.11, p. 799-804, 2002.

AMORES, R.; CALVO, A.; MAESTRE, J. R.; MARTÍNEZ-HENNÁNDEZ, D. Probióticos. **Revista Española de Quimioterapia.** Vol. 17, n. 2, p. 131-139, junho, 2004.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em : <www.anvisa.gov.br>. Acesso em junho de 2011.

ARAUZ, L.J.; JOZALA, A.F.; MAZZOLA, P.G.; PENNA, T.C.V. Nisin biotechnological production and application: A review. **Trends in Food Science and Technology.** v.20, p.146-154, 2009.

AXELSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: *Salminen S, Von Wright A (eds) Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects.* Marcel Dekker, New York, 1998, p. 1-71.

BADARÓ, A. C. L.; GUTTIERRES, A. P. M.; REZENDE, A. C. V.; STRINGHETA, P. C. Alimentos probióticos: Aplicações como promotores da saúde humana – parte 1. **Nutrir Gerais.** v. 2, n. 3, 29 p., 2008.

BARON, M., DENIS, R. y VUILLEMARD, J. Biochemical characteristics of fermented milk produced by mixed-cultures of lactic starters and bifidobacteria. **Le Lait Dairy Science and Technology,** vol. 80, n. 5, p.465–478, 2000.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA. RDC n.º 2, de 7 de janeiro de 2002. Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Islados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02_02rdc.htm. Acesso em 06 de março de 2012.

BRINQUES, G. B. **Otimização da produção de probióticos em biorreatores e sua aplicação em sistemas alimentícios sob a forma imobilizada**. Porto Alegre, 2009. 135p. Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

CANDELA, M.; PERNA, F.; CARNEVALI, P.; VITALI, B.; CIATI, R.; GIONCHETTI, P.; RIZZELLO, F.; CAMPIERI, M.; BRIGIDI, P. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. **International Journal of Food Microbiology**. v.125, p. 286-292, 2008.

CASTRO-CISLAGHI, F. P.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; SANT'ANNA, E. S. Potencial do soro de leite líquido como agente encapsulante de *Bifidobacterium* Bb-12 por *spray drying*: comparação com goma arábica. **Ciência Rural**. v. 42, n. 9, 2012.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**. v.34, n.4, p.1297-1303, 2004.

CROSS, M.L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v.34, n.4, p.245-253, 2002.

ÇAGLAR, E., KUSCU, O. O., CILDIR, K. S. et al. A probiotic lozenge administered medical device and its effect on salivary mutans streptococci and lactobacilli. **International Journal of Paediatric Dentistry**. v. 18, n. 1, p. 35-39, 2008.

DE VRESE, M. et al. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.73, n.2, p.421S-429S, 2001.

DORELLA, F. A.; MIYOSHI, A.; PONTES, D. S.; AZEVEDO, V. Expressão de proteínas heterólogas em *Lactococcus lactis*. **R. Ci. méd. biol.**, Salvador, v. 2, n. 1, p. 123-132, 2003.

FARIAS, C. M. M.; MAGALHÃES, O. M. C. Taxa de viabilidade e capacidade fosfolipásica de culturas de *Geotrichum* estocadas na micoteca URM. In: XVII Congresso de Iniciação Científica e I Congresso de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação. Universidade Federal de Pernambuco. 2009. 4 p.

GLOSSÁRIO PAPEL. Disponível em: <<http://panucarmi2.wikidot.com/glossariotipospapel>>. Acesso em 16 de fevereiro de 2013.

GOKTEPE, I. Probiotics as Biopreservatives for Enhancing Food Safety. **Probiotics in Food Safety and Human Health**. p. 285-307, 2006.

GOLOWCZYC, M. A.; SILVA, J.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L.; TEIXEIRA, P. Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. **Letters in Applied Microbiology**, v.50, p.7-12, 2010.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotic. **Trends and food science & technology**, v. 10, p. 139-158, 1999.

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

GUIA DO ALUMÍNIO. Disponível em: < <http://www.guiadoaluminio.com.br>>. Acesso em 16 de fevereiro de 2013.

HAMIN NETO, Y. A. A. Fermentação, purificação, caracterização bioquímica e microencapsulação de protease produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2012.

HARRIS, L.J.; DAESCHEL, M.A.; STILES, M.E.; KLAENHAMMER, T.R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.51, p.29-31, 1989.

HE, X.; LUX, R.; KURAMITSU, H. K.; ANDERSON, M. H.; SHI, W. Achieving probiotic effects via modulating oral microbial ecology. **Advances in Dental Research**. v. 21, n. 1, p. 53-56, 2009.

HOLZAPFEL, H. W.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 73, p. 365-373, 2001.

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

ISOLAURI, E; SALMINEN, S; OUWEHAND, A. C. **Probiotics. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 2, p. 299-313, 2004.

GONDIM, B. L. C. Análise da colonização formação de *Streptococcus mutans* sobre materiais dentários restauradores. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010. 60 p.

JACOBSEN, C. et al. Screening of probiotic activities of forty seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, p. 4949-4956, 1999.

JALILI, H.; RAZAVI, S. H.; SAFÁRI, M.; MALCATA, F. X. Enhancement of growth rate and β -galactosidase activity, and variation in organic acid profile of *Bifidobacterium animalis* subspec. *lactis* Bb12. **Enzyme and Microbial Technology**, v.45, p. 469-476, 2009.

LEROY, F.; DEVUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**. v.15, p. 67-78, 2004.

LIMA, A. A. N.; CRISTIANINI, M. **Ação antimicrobiana da lisozima sobre *Lactobacillus brevis* em um sistema tampão**. In: XII Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp. 1 p. 2004.

LORENZ, J. G. Comparação dos métodos de emulsificação e *spray drying* na microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* (la-5) e aplicação em sorvete. Dissertação. Programa de PósGraduação em Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009. 79p.

LUYO, A. P. Probióticos: Una nueva alternativa em la prevención de la caries dental? **Revista Estomatol Herediana**. vol. 18, n.1 p. 65-68, 2008.

MARGUET, E. R.; VALLEJO, M.; CHICHISOLA, V. S.; QUISPE, J. L. Actividad antagonista de bacterias lácticas aisladas del medio marino contra cepas de *Listeria*. **Acta bioquímica clínica latinoamericana**. n. 45, n. 2, La Plata, 2011.

MATTILA-SANDHOLM, T.; SALMINEN, S. Up-to-date on probiotics in Europe. **Gastroenterology International**, v.11, p. 8–16, 1998.

MELO, P.; TEIXEIRA, L.; DOMINGUES, J. A importância do despiste precoce de cárie dentária. **Revista Port Clin Geral**, vol. 22, p. 357-366, 2006.

MITSUOKA, T. Significance of dietary modulation of intestinal flora and intestinal environment. **Bioscience and Microflora**, vol. 19, n. 1, p. 15-25, 2000.

MORAES, P. M.; PERIN, L. M.; ORTOLONI, M. B. T.; Yamazi, A. K.; Viçosa, G. N.; Nero, L. A. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. **Food Science and Technology**. Viçosa, v.43, p.1320-1324, 2010.

MÜLLER, P. S. Microencapsulação do óleo essencial de laranja. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011. 99 p.

NAIDU, A.S.; BIDLACK, W.R.; CLEMENS, R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.38, n.1, p.13-126, 1999.

NEOBRAx. Clorexidina – Relatório técnico. Disponível em: <<http://www.neobrax.com.br/download/clorexidina.pdf>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2013.

NIKAWA, H.; MAKIHIRA, S.; FUKUSHIMA, H. *et al.* Lactobacillus reuteri in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. **Journal Food Microbiol.** v. 95, n. 2, p. 219-23, 2004.

NOGUEIRA, M. A.; DIAZ, M. G.; TAPAGAMI, P. M.; LORSCHHEIDE, J. Atividade microbiana de óleos essenciais e extratos de própolis sobre bactérias cariogênicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. V. 28, n.1, p.93-97, 2007.

OELSCHLAEGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions – a review. **International Journal of Medical Microbiology**. Amsterdam, v. 300, p. 57-62, 2010.

OGAWA, M. *et al.* Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 by probiotic Lactobacillus strains due to production of lactic acid. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.68, n.1-2, p.135-140, 2001.

OLIVEIRA, A. C. Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por *spray drying* e leite de jorro. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2006. 77p.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v. 38, n. 1, 21p., 2002.

OLMOS, J. A. C. **Elaboración de Quesillo de Leche de Soya (Glycine max) con Adición de Bacterias Probióticas (Lactobacillus casei shirota y Bifidobacterium lactis Bb12)**. Valdivia - Chile, 2006. 73 p. Tesis. Licenciatura en Ciencia de los Alimentos, Universidad Austral de Chile.

ORTOLANI, M. B. T. Bactérias ácido lácticas autóctones de leite cru e queijo minas frescal: isolamento de culturas bacteriocinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 2009.

PARIZE, A.; ROZONE, T.; COSTA, I.; FÁVERE, V.; LARANJEIRA, M.; SPINELLI, A. ; LONGO, E. Microencapsulation of the natural urucum pigment with chitosan by spray drying in different solvents. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 7, p.3107-3114. 2008.

PARVEZ, S.; MALIK, K.A.; KANG, S.; KIM, H. Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**. v. 100, n. 6, p. 1171-1185, 2006.

PETTI, S., TARSITANI, G., D'ARCA, A. S. A randomized clinical trial of the effect of yoghurt on the human salivary microflora. **Archives of Oral Biology**. v. 43, n. 8, p. 705-712, 2001.

PIDOUX, M. The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. **MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 5, n. 2, p.223-238, 1989.

POLIVINILPIRROLIDONA. Disponível em: <http://qnint.s bq.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=jSk7dFagsfhIxmNiCwDBhbFrE2eVdwIzWIRjNS4OJDbghVowVt3p8G3OYZMhLwlzpMtkTUulZA5zNo9VHGwwQ==>. Acesso em 10 de janeiro de 2013.

POFFO, F.; SILVA, M. A. C.; Caracterização taxonômica e fisiológica de bactérias ácido lácticas isoladas de pescado marinho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 2, p. 303-307, 2011.

RAPACCI, M.; DELLANI, M. Microencapsulamento de bactérias lácticas probióticas para aplicação em granola comercial. In: XIV Seminário de Iniciação Científica & VIII Mostra de Pesquisa da PUCPR. 2006.

RIBEIRO, N. M. E.; RIBEIRO, M. A. S. Estudo *in situ* da cariogenicidade do leite humano: aspectos clínicos. **Jornal de Pediatria**. vol. 80, n. 5, nov. 2004, Porto Alegre.

ROY, D. 2001. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. **International Journal of food microbiology**. 69: 167-182.

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

SANBIOS. Disponível em: <<http://www.coopsantaclara.com.br/sanbios/conheca.php>>. Acesso em 28 de agosto de 2012.

SCHINTTLER, L. Isolamento e caracterização fenotípica e molecular de bactérias ácido lácticas bacteriocinogênicas em leite in natura da região oeste de Santa Catarina. Tese.

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, 2012.

SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, v. 27, p. 691-697, 2010.

SHAH, N. P. Funcional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 11, p. 1262-1277, 2007.

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

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. D. S.; MEDEIROS, A. B. P.; YAMAGUISHI, C. T.; DE DEALINDNER, J.; PANDEY, A.; THOMAZ-SOCCOL, V. The potential of the probiotics: a review. **Food Technology and Biotechnology**. Curitiba, v. 48, n. 4, p. 413-434, 2010.

SOLANO-AGUILAR, G.; DAWSON, R.; RESTREPO, M.; ANDREWS, K.; VINYARD, B.; URBAN, J. F. Detection of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bb12) in the intestine after feeding of sows and their piglets. **Applied and Environmental microbiology**, v. 74, n. 20, p. 6338-6347, 2008.

SOUZA, C. V. A.; HIRATA, R. J.; UZEDA, M.; WEYNE, F. C. Efeitos do consumo diário de probiótico sobre a microbiota cariogênica. **Revista Brasileira de Odontologia**, Rio de Janeiro, v. 68, n. 1, p. 128-131, jan./jun. 2011.

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

SULLIVAN, A.; NORD, C. E. Probiotics in human infections. *J Antimicrob Chemother*, 2002. p. 625-627.

SUNNY-ROBERTS, E.O.; KNORR, D. The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders. **International Dairy Journal**, v.19, p.209-214, 2009.

TUKEL, Ç. L.; AVS,AROGLU, M. D.; SIMSEK, O.; AKÇELIK, M. Isolation and partial characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* MC38. **Journal of Food Safety**. n. 27, p. 17-29, 2007.

VILLENA, M. J. M.; HERNÁNDEZ, M. E. M.; LARA, V. G.; MARTÍNEZ, M. A. R. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. **Ars Pharmaceutica**. v. 50, n. 1, p. 43-50, 2009.

YAKULT. Disponível em: <www.yakult.com.br>. Acesso em 28 de agosto de 2012.

YLI-KNUUTTILA, H., HAUKIOJA, A., LOIMARANTA, V. *et al.* Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. **Oral Microbiol. Immunol.** 2006, 21 (5): p. 326-332.

WANDREY, C.; BARTKOWIAK, A.; HARDING, S. Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing. Capítulo 3. Editora Springer Science Bussines Media, Lausanne, Suíça. p. 83-86, 2010.

WANG, J.; CAO, Y.; SUN, B.; WANG, C. Physicochemical and release characterisation of garlic oil-b-cyclodextrin inclusion complexes. **Food Chemistry**. v.127, p. 1680-1685, 2011.

ZACARCHENCO, P.B. **Leites fermentados por *S. thermophilus* adicionados de *L. acidophilus* e *B. longum*: Isolamento diferencial dos microrganismos, multiplicação em diferentes condições e feitos das características sensoriais dos leites fermentados naturais e modificados**. Campinas, 2004. 181p. Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

ZHAO, R.; SUN, J.; TORLEY, P.; WANG, D.; NIU, S. Measurement of particle diameter of *Lactobacillus acidophilus* microcapsule by spray drying and analysis on its microstructure. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.1349-1354, 2008.