

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Carmen de Oliveira Goulart

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DOS ASPECTOS TECNOLÓGICOS
SOBRE AS CARACTERÍSTICAS E A VIABILIDADE DE CULTURAS
PROBIÓTICAS EM FORMULAÇÕES ALIMENTÍCIAS**

Belo Horizonte

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Carmen de Oliveira Goulart

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DOS ASPECTOS TECNOLÓGICOS
SOBRE AS CARACTERÍSTICAS E A VIABILIDADE DE CULTURAS
PROBIÓTICAS EM FORMULAÇÕES ALIMENTÍCIAS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito avaliativo do
curso de Especialização em Microbiologia do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais para
obtenção do título de Especialista em
Microbiologia Ambiental e Industrial.

Professor (a) Orientador: Dra. Elisabeth
Neumann

Belo Horizonte

2014

043 Goulart, Carmen de Oliveira.

Estudo da influência dos aspectos tecnológicos sobre as características e a viabilidade de culturas probióticas em formulações alimentícias [manuscrito] / Carmen de Oliveira Goulart. – 2014.

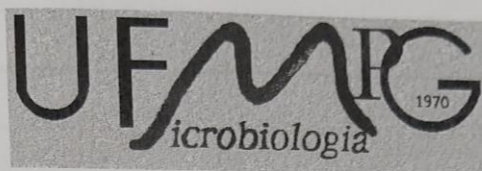
51 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dra. Elisabeth Neumann.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito avaliativo do curso de Especialização em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Especialista em Microbiologia Ambiental e Industrial.

1. Microbiologia. 2. Probióticos. 3. Bifidobacterium. 4. Lactobacillus. I. Neumann, Elisabeth. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**

Às 08:00 horas do dia 25 de fevereiro de 2015, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG a Banca Debatedora constituída pela Profa. Camila Nair Batista Couto Villanoeva, e pela Profa. Elisabeth Neumann - Orientadora, para avaliar a **Monografia** intitulada "Estudo da influência dos aspectos tecnológicos sobre as características e a viabilidade de culturas probióticas em formulações alimentícias e farmacêuticas", da aluna **Carmem De Oliveira Goulart**. Após a apresentação oral pública seguida de uma arguição, a aluna foi APROVADA, considerando as sugestões feitas pela Banca debatedora. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que será assinada pelos membros participantes da Banca Debatedora. Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2015.

Profa. Camila Nair Batista Couto Villanoeva Camila N.B. C. Villanoeva

Profa. Elisabeth Neumann - Orientadora Elisabeth Neumann

Edel Figueiredo Barbosa Stancioli
Profa. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

Coordenadora do Curso de Especialização em Microbiologia
ICB/UFMG

RESUMO

O propósito da administração de produtos probióticos é resultar em uma microbiota intestinal balanceada, a qual, por sua vez, terá um impacto favorável sobre a saúde do consumidor. Os estudos e a crescente utilização dos diversos produtos lácteos probióticos, principalmente fermentados, e alguns não lácteos, fizeram despertar em todo o mundo uma preocupação com a sua eficácia, pois o processamento inadequado dos produtos alimentícios podem ocasionar a degradação das estirpes probióticas e consequente perda de suas atividades. Dessa forma, para que os efeitos benéficos dos probióticos sejam alcançados faz-se necessário garantir a sobrevivência dos micro-organismos probióticos durante a sua elaboração e o seu armazenamento e também à passagem pelo trato gastrointestinal. Esses requisitos representam desafios tecnológicos significativos, uma vez que muitas bactérias probióticas são sensíveis à exposição ao oxigênio, ao calor e a ácidos, apresentando diversos problemas em relação à viabilidade e a resistências das estirpes. Entre as alternativas que podem ser utilizadas para preservar as características das culturas probióticas, destacam-se as tecnologias de fermentação, de secagem e de encapsulação em micropartículas. Os principais desafios encontrados na manutenção da viabilidade das culturas probióticas durante o desenvolvimento e armazenamento de produtos alimentícios e formulações probióticas serão discutidos na presente revisão bibliográfica.

Palavras - chaves: Micro-organismos probióticos, Produtos probióticos, Aspectos tecnológicos, Viabilidade, *Bifidobacterium*, *Lactobacillos*, Encapsulação.

ABSTRACT

The purpose of the administration of probiotic products is result in a balanced intestinal microbiota, which, in turn, will have a favorable impact on consumer health. The studies and the increasing use of many probiotic dairy products, particularly fermented milk and some do not, have wake worldwide concern for its effectiveness since improper handling of food products and pharmaceutical formulations can cause degradation of probiotic strains and consequent loss of their activities. Thus for the beneficial effects of probiotics are achieved is - if necessary to ensure the survival of probiotic microorganisms during its preparation and storage and also the passage through the gastrointestinal tract. These conditions represent significant technological challenges, since many probiotic bacteria are sensitive to exposure to oxygen, heat and acids, with several issues regarding the feasibility and the resistance of the strains. Among the alternatives that can be used to preserve the characteristics of probiotic cultures, there are the technologies fermentation, drying and encapsulation in the micro particles. The main challenges faced in maintaining the viability of probiotic cultures during development and storage of food products and probiotic formulations are discussed in this literature review.

Key words: Microorganisms probiotics, probiotic products, technological aspects, Viability , *Bifidobacterium* , *Lactobacillos*, Encapsulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática simplificada das vias do metabolismo homofermentativo e heretofermentativo em bactérias lácticas.....	22
Figura 2. Estrutura básica da parede celular Gram – negativa.	23
Figura 3. Estrutura básica da parede celular Gram – positiva.	23
Figura 4. Representação da estrutura física de uma microcápsula.	35
Figura 5. Representação esquemática do processo de spray drying.	39
Figura 6. Representação esquemática do processo de micro-encapsulação pelo método de liofilização.....	41
Figura 7. Representação esquemática do processo de microencapsulação por emulsificação.	43
Figura 8. Representação esquemática do processo de microencapsulação pelo método de extrusão.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Micro-organismos probióticos regulamentados pela ANVISA	15
Tabela 2 - Principais produtos alimentícios probióticos comercializados no Brasil.	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVO	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos	11
3 JUSTIFICATIVA	12
4 METODOLOGIA.....	13
5 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
5.1 Alimentos probióticos: Definição, Composição e Função	14
5.2 Principais micro-organismos probióticos, seu papel na microbiota intestinal e a sua influência sobre a saúde	16
5.2.1 Lactobacillus e Bifidobacterium.....	16
5.2.2 Efeitos benéficos na saúde.....	17
5.2.3 Mecanismos de ação das bactérias probióticas	18
5.2.4 Metabolismo das bactérias probióticas	20
5.3 Probióticos e formulações alimentícias disponíveis no mercado.....	27
5.4 Critérios utilizados na seleção dos probióticos	28
5.4.1 Critérios de segurança.....	30
5.4.2 Critérios de funcionalidade.....	30
5.4.3 Critérios tecnológicos.....	31
5.5 Influências dos aspectos tecnológicos sobre as características e a viabilidade de culturas probióticas	31
5.5.1 Tolerância à acidez	31
5.5.2 Presença de oxigênio	32
5.5.3 Presença de ingredientes e aditivos alimentares.....	33
5.5.4 Métodos de conservação das linhagens.....	34
5.5.5 Microencapsulação de probióticos.....	35
5.5.6 Principais técnicas utilizadas na encapsulação de culturas probióticas.....	37
5.5.6.1 Spray Drying	38
5.5.6.2 Liofilização.....	40
5.5.6.3 Emulsificação.....	42
5.5.6.4 Extrusão.....	43
6 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

As modificações no estilo de vida da sociedade têm afetado a qualidade da vida do homem atual e aumentado o interesse por novos conceitos da nutrição da vida moderna. A população tem cada vez mais se conscientizado da importância do consumo de alimentos que além de saciar a fome contenham substâncias que auxiliam a promoção da saúde, melhorando o estado nutricional do consumidor. Assim, o conceito de nutrição vem sendo otimizado por alimentos funcionais, ou seja, que além das funções nutritivas básicas, quando consumidos como parte da dieta usual, produzem efeitos metabólicos, fisiológicos benéficos à saúde, devendo ser seguros para consumo sem supervisão médica (BADARÓ et al, 2009).

Esses alimentos possuem potencial para promover à saúde através de mecanismos não previstos na nutrição convencional, entretanto o efeito obtido restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças. A incorporação cada vez mais frequente destes alimentos a dieta leva a um estilo de vida saudável, o que por sua vez tem levado à criação de um mercado para esses produtos (KOMATSU et al, 2008).

Um importante grupo de alimentos funcionais é o dos probióticos, que são definidos como preparações contendo micro-organismos vivos, ou componentes microbianos que quando ingeridos em quantidade adequada apresentam efeito benéfico sobre a saúde e bem-estar do hospedeiro, aumentando o valor nutricional e terapêutico dos alimentos por garantir equilíbrio no trato gastrointestinal. As espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os micro-organismos mais eficazes e mais comumente usados como probióticos (HUNGRIA E LONGO, 2009).

As bactérias probióticas utilizadas em produção de escala industrial devem ser apropriadas para cada tipo de produto e manter-se com boa viabilidade durante todo o processamento e armazenamento do produto. Esses pré-requisitos representam desafios tecnológicos significantes, uma vez que muitas bactérias probióticas são sensíveis à exposição ao oxigênio, ao calor e a ácidos. Dessa forma para manter a sua funcionalidade uma preparação probiótica deve apresentar um longo tempo de sobrevivência nas condições de armazenamento e comercialização,

assim como um número adequado de células viáveis no produto original e a capacidade de sobreviver no trato digestivo (KOMATSU et al, 2008).

Para garantir um efeito contínuo no organismo humano, os probióticos devem ser ingeridos diariamente. Alterações favoráveis na composição da microbiota intestinal, capazes de garantir a manutenção das concentrações ativas fisiologicamente (quantidade intestinal de 10^6 a 10^7 UFC/g) *in vivo*, foram observadas com doses de 100 g de produto alimentício contendo 10^8 a 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) de micro-organismos probióticos (10^6 a 10^7 UFC/g de bioproduto) (SAAD, 2006).

No Brasil, atualmente, a recomendação é que um alimento funcional probiótico deve apresentar, tendo como base a porção diária de micro-organismos viáveis que devem ser ingeridos, uma concentração mínima de 10^8 a 10^9 UFC/dia do produto pronto para consumo, sendo ele sólido (10^8 a 10^9 UFC/g) ou líquido 10^8 a 10^9 UFC/ mL)(Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2007).

A sobrevivência, assim como a manutenção dos níveis populacionais do micro-organismo, são fatores fundamentais para atuação dos probióticos visto que os níveis do micro-organismo devem ser suficientemente elevados para ter um impacto no local onde se espera que ele desenvolva a sua função. Dessa forma, uma seleção adequada de estirpes deve ser conduzida para que o processamento e o armazenamento dos produtos probióticos ocorra de forma adequada, preservando as estirpes selecionadas (KOMATSU et al, 2008).

Outro fator importante para atuação dos probióticos está relacionado à multiplicação dos micro-organismos selecionados. A multiplicação das estirpes probióticas pode resultar em características não peculiares ou mesmo indesejáveis ao alimento, devido a produção excessiva de ácido acético e ácido lático durante o processo de fermentação. Estes metabolitos acabam por acarretar restrições sensoriais, influenciando no sabor e no aroma do produto final. Assim, a utilização de veículos alimentícios apropriados para as estirpes probióticas é fundamental, bem como a verificação da compatibilidade e adaptabilidade entre as estirpes selecionadas e os referidos veículos (KOMATSU et al, 2008).

A seleção de estirpes probióticas deve ser direcionada aos efeitos desejáveis para o produto específico ou para a população-alvo do produto. Além da seleção adequada de estirpes, o método de sua preparação é de extrema importância. Além de boa viabilidade no intestino, as propriedades tecnológicas são pré-requisitos para

a utilização potencial de culturas probióticas. Pouca atenção tem sido dispensada ao efeito da tecnologia sobre os produtos probióticos. Assim, todos os aspectos relacionados à capacidade de resistência dos micro-organismos probióticos ao processamento industrial e à sua sobrevivência durante a fase de armazenamento dos produtos probióticos alimentícios devem ser estudados cuidadosamente, uma vez que as tecnologias de fermentação, de secagem e de microencapsulação das culturas influenciam significativamente a funcionalidade dos probióticos (ALVES, 2013).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Essa revisão bibliográfica busca apresentar os efeitos benéficos que a ingestão de probióticos pode oferecer à saúde e avaliar a influência dos aspectos tecnológicos na elaboração de formulações probióticas, buscando descrever suas limitações e alternativas.

2.2 Objetivos específicos

- Definir os alimentos probióticos e apresentar os principais grupos compostos por estes micro-organismos.
- Descrever os benefícios dos probióticos à saúde, bem como a sua aplicação na indústria alimentícia, e a legislação pertinente.
- Informar e esclarecer os conceitos, as aplicações e as influências dos aspectos tecnológicos sobre as características e a viabilidade das culturas probióticas durante o seu processamento na indústria alimentícia.
- Avaliar a sobrevivência dos probióticos frente à acidez, ou seja, em condições similares as do estômago, e frente à presença de oxigênio.
- Avaliar a resistência dos micro-organismos probióticos durante os processos tecnológicos de Microencapsulação.

3 JUSTIFICATIVA

Atualmente, diversas pesquisas têm sido realizadas com a finalidade de assegurar tanto o bem estar como à saúde da população. Dessa forma o desenvolvimento e a produção de alimentos que proporcionem ao consumidor um risco cada vez menor de desenvolvimento de doenças e ao mesmo tempo fortaleçam o seu organismo tem surgido como um desafio para as indústrias alimentícias. A utilização dos probióticos tem sido apresentada como uma alternativa para vencer estes desafios, uma vez que às propriedades e os efeitos destes produtos beneficiam a promoção da saúde, através do equilíbrio da microbiota intestinal. Dessa forma estes produtos vêm sendo cada vez mais ofertados e consumidos, constituindo hoje prioridade de pesquisa em todo mundo. O atual interesse da indústria e do comércio e à importância dos micro-organismos vivos na alimentação humana justifica a realização desse estudo, no qual a análise da viabilidade de bactérias probióticas será avaliada levando – se em consideração os aspectos tecnológicos e os seus efeitos sobre as culturas probióticas.

4 METODOLOGIA

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica sobre os principais aspectos tecnológicos atuais e potenciais de probióticos nos últimos 10 anos, utilizando as seguintes bases de dados: Scientific Electronic Library Online-SCIELO e Periódicos Capes. Como palavras chaves foram utilizadas: Micro-organismos probióticos, Produtos probióticos, Aspectos tecnológicos, Viabilidade, *Bifidobacterium*, *Lactobacillos*.

5 REFERENCIAL TEÓRICO

5.1 Alimentos probióticos: Definição, Composição e Função

Diversas definições foram propostas para o termo probióticos. FULLER¹ (1989 apud SAAD, 2006) classificou os probióticos como suplementos alimentares baseados em micro-organismos vivos que influenciavam positivamente o hospedeiro, promovendo benefícios. HAVENAAR² *et al.* (1992 apud SANTOS, 2013) optaram por classificar os probióticos como culturas puras ou mistas de micro-organismos vivos que quando aplicadas aos animais ou ao homem, proporcionam benefícios, promovendo o balanço de sua microbiota intestinal.

Atualmente, a definição mais aceita refere-se ao conceito dado pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (WHO) (FAO/WHO, 2002) de que probióticos são organismos vivos (bactérias ou leveduras) que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas, cuja ingestão leva a importantes mudanças fisiológicas ao organismo, através do equilíbrio da microbiota intestinal.

Os principais critérios para um micro-organismo ser considerado probiótico são: apresentar resistência à acidez gástrica e aos sais biliares (o baixo pH gástrico é um dos primeiros mecanismos de defesa contra a ingestão de micro-organismos); apresentar capacidade de aderir nas células da mucosa intestinal para aumentar a persistência e multiplicação dos micro-organismos no intestino (o que promove exclusão competitiva de patógenos potenciais da superfície intestinal); produzir compostos antimicrobianos, como, principalmente, bacteriocinas, ácidos orgânicos voláteis e peróxido de hidrogênio, uma vez que estas substâncias atuam no combate aos patógenos intestinais, auxiliando assim na restauração da composição da microbiota intestinal; devem ser seguros em alimentos e durante o uso clínico, mesmo em indivíduos imunocomprometidos; apresentar capacidade de ser produzido em grande escala e de forma viável (também é importante que seja viável e ativo no produto que servirá de veículo); apresentar segurança aprovada para o consumo humano, através de meios científicos e experiências baseadas no consumo de alimentos por um grande número de consumidores; serem isolados do

trato gastrointestinal humano, pois acredita-se que são mais seguros e mais efetivos na microbiota intestinal humana (ANAL E SINGH, 2007).

No Brasil, os probióticos atualmente regulamentados pela a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (Tabela 1), para aplicação em alimentos com alegação de propriedades funcionais, são *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *ramnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium* (BRASIL, 2008).

Tabela 1. Micro-organismos probióticos regulamentados pela ANVISA

PROBIÓTICOS
<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus casei Shirota</i>
<i>Lactobacillus casei</i> variedade <i>ramnosus</i>
<i>Lactobacillus casei</i> variedade <i>defensis</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus lactis</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>Bifidobacterium animalis</i> (incluindo a subespécie <i>B.lactis</i>)
<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>

Fonte: (BRASIL, 2008).

Bactérias não lácticas como *Escherichia coli* e organismos não bacterianos como leveduras, *Saccharomyces cerevisiae*, também são descritas como micro-organismos probióticos (SANDERS et al., 2007).

Muitos estudos clínicos têm demonstrado a eficácia terapêutica e profilática de probióticos específicos contra gastroenterite viral aguda, diarreia associada a antibióticos, infecção por *Clostridium difficile* e por *Helicobacter pylori*, doença intestinal inflamatória e síndrome do intestino irritado. Os efeitos dos probióticos são estirpe-dependentes, desse modo, cada estirpe proporciona diferentes benefícios para a saúde do consumidor (CHEN E CHEN, 2007).

5.2 Principais micro-organismos probióticos, seu papel na microbiota intestinal e a sua influência sobre a saúde

As estirpes probióticas mais conhecidas pertencem ao gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (ROKKA E RANTAMAKI, 2010). Estes micro-organismos são considerados os micro-organismos probióticos mais importantes por terem um efeito benéfico no trato gastrointestinal (ANAL E SINGH, 2007).

5.2.1 *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*

Tradicionalmente usadas em alimentos fermentados, os *Lactobacillus* constituem um grupo heterogêneo de bactérias fermentativas estritas, produtoras de ácido láctico. As espécies mais comuns encontradas no intestino humano são o *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius* e *Lactobacillus casei* (ROKKA E RANTAMAKI, 2010).

Devido à resistência ao ácido e à bÍlis, à sua atividade antimicrobiana e a sua sobrevivência no trânsito gastrointestinal, o *Lactobacillus acidophilus* é o mais usado em preparações probióticas. O *Lactobacillus salivarius* é conhecido pela sua resistência ao ácido e à bÍlis, e também pela boa capacidade de aderência às células epiteliais do trato gastrointestinal. Dentro do gênero *Lactobacillus* destaca-se também o *L. casei*. A obtenção de células deste micro-organismo é em geral realizada por cultivo em matriz líquida, no qual são empregados substratos de baixo custo, tal como o soro de leite, viabilizando assim, a sua produção em grandes escalas. O conhecimento da fisiologia, metabolismo, utilização de diferentes nutrientes, temperatura e pH de crescimento permite obter um melhor controle do processo (HUNGRIA; LONGO, 2009).

As *Bifidobacterium* residem geralmente no intestino grosso. São micro-organismos gram-positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, catalase negativos e estritamente anaeróbios. Pode apresentar formas variadas que incluem bacilos curtos e curvados e bacilos bifurcados, que crescem em meios com pH de 4,5-8,5. O produto final da fermentação são o ácido láctico e o ácido acético (ROKKA E RANTAMAKI, 2010).

O gênero *Bifidobacterium* é de extrema importância para o trato gastrointestinal do ser humano e de outros mamíferos e inclui cerca de 30 espécies,

10 das quais são de origem humana, 17 de origem animal, 2 de águas residuais e 1 de leite fermentado. Estão inseridas na ordem das actinomicetas, sendo organismos heterofermentativos, que produzem ácidos acético e láctico, sem produção de CO₂, exceto durante a degradação do gluconato. As bifidobactérias, de origem humana, são capazes de utilizar além do gluconato, a galactose, a lactose e a frutose como fontes de energia (NOGUEIRA E GONÇALVES, 2011).

Estão amplamente distribuídos, sendo a razão em que eles se encontram dependente da idade e da dieta alimentar. As *Bifidobacterium longum*, *B. infantis* e *B. breve* presentes no cólon, são frequentemente usadas como culturas probióticas (ROKKA E RANTAMAKI, 2010).

5.2.2 Efeitos benéficos na saúde

O sistema gastrointestinal humano constitui um ecossistema complexo, que é colonizado por bactérias de várias espécies. Um epitélio intestinal saudável é constituído pela microbiota intestinal, cuja função passa por criar uma barreira contra a absorção de micro-organismos patogênicos, bem como a de compostos nocivos através do lúmen do intestino (VARAVALLO, et al., 2008).

Ao serem ingeridos por meio dos alimentos, os probióticos vão para o intestino e ali se somam à microbiota já existente, sem se fixarem, equilibrando-a e, com isso, auxiliam o trabalho de absorção dos nutrientes (VARAVALLO et al., 2008). Dessa forma o consumo de alimentos probióticos tem como função o estabelecimento de uma microbiota que contribui para a atividade saudável do intestino (HUNGRIA; LONGO, 2009).

Os micro-organismos probióticos desempenham um importante papel terapêutico, ou preventivo, quando ingeridos em dose e tempo adequado. Seus efeitos benéficos são reconhecidos em diferentes áreas como: nas doenças associadas ao trato gastrointestinal, através da prevenção de diarreia causada por algumas bactérias patogênicas e vírus; do controle de infecções e complicações associadas à *Helicobacter pylori* (gastrite tipo B, úlcera péptica e câncer gástrico); do tratamento de doenças inflamatórias do intestino (doença de Crohn); da prevenção de alguns tipos de câncer (redução dos níveis de compostos carcinogênicos); do controle da constipação; do aumento da tolerância à lactose; e da imunidade da mucosa intestinal; no tratamento de doenças hepáticas; no tratamento de doenças

alérgicas; no tratamento de doenças cardiovasculares, como, síndromes isquémicas do coração, diminuição do colesterol sérico e hipertensão; e até mesmo no tratamento de distúrbios do trato urogenital (infecções urinárias) (HUNGRIA; LONGO, 2009).

5.2.3 Mecanismos de ação das bactérias probióticas

Uma das teorias mais aceitas como mecanismo de atuação dos probióticos é a teoria da exclusão competitiva. De acordo com esta teoria, o probiótico compete fisicamente com os possíveis patógenos pelos nutrientes do nicho ecológico e/ou pelos sítios de adesão, impedindo assim a sua proliferação e formando uma barreira física na mucosa. Barreira esta que justifica sua atividade moduladora de reações alérgicas alimentares. Esta teoria confirma a necessidade de administração continuada dos probióticos a fim de conferir seus benefícios. O conjunto de atividades dos probióticos pode ser dividido em efeitos antimicrobianos, nutricionais e fisiológicos. A utilização de culturas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas em detrimento de bactérias potencialmente patológicas, reforçando os mecanismos naturais de proteção (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

Os probióticos facilitam a formação da chamada barreira probiótica no intestino, impedindo, assim, a colonização da microbiota por bactérias patogênicas. Alguns dos mecanismos descritos para esse impedimento é a competição que ocorre no intestino favorecendo as bactérias probióticas, o estímulo do sistema imunológico facilitando a defesa do organismo, significativa redução dos níveis de colesterol total com diminuição do LDL colesterol, melhora da digestão de proteínas e aumento da absorção de vitaminas e minerais (VARAVALLO et al., 2008).

A capacidade dos probióticos de promover a proteção da barreira epitelial se deve basicamente a duas propriedades: Competição por nutrientes e/ou competição entre linhagens patogênicas e microrganismos probióticos pelos mesmos sítios de adesão (exclusão competitiva), além da indução da síntese de defensinas e muco (ALVIM, 2011).

As bactérias probióticas ocupam os sítios de ligações (receptores ou pontos de ligação) na mucosa intestinal, formando um tipo de barreira física às bactérias patogênicas. Assim, as bactérias patogênicas não conseguem se ligar a esses

receptores e consequentemente são excluídas pela competição por sítios de ligação (VARAVALLO et al., 2008).

A aderência bacteriana ao epitélio intestinal envolve vários fatores, sendo que o processo inicial é baseado em interações físico-químicas, que estão relacionadas às cargas elétricas presentes e a hidrofobicidade da parede celular do microrganismo. A ligação dos probióticos com células epiteliais do intestino como, por exemplo, as células de Paneth e enterócitos, estimulam a produção de defensinas e muco, respectivamente, substâncias importantes na proteção das superfícies mucosas contra invasão por patógenos (ALVIM, 2011).

A perda de integridade da mucosa intestinal varia com os indivíduos estando associada à idade, ao *stress*, à dieta e a certas terapias. A suplementação da dieta com probióticos constitui uma alternativa a este problema, uma vez que permite assegurar a manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal. Quando ingeridos, estes suplementos ajudam a estabilizar a microbiota intestinal através da aderência e da colonização da mucosa, o que contraria a possibilidade de produção e de ligação de toxinas ou invasão das células epiteliais por bactérias patogênicas (ALVES, 2013).

A sua ação também baseia-se na capacidade de degradar componentes alimentares, na produção de certas vitaminas do tipo B, na produção de enzimas envolvidas no processo de digestão de algumas substâncias e ainda na capacidade de metabolizar substâncias cancerígenas (VARAVALLO et al., 2008).

O benefício dos probióticos frente à diarreia é apresentado em diferentes estudos, e está relacionado a esta inibição da atividade de outros micro-organismos patogênicos (BALLUS et al., 2010). A atividade antimicrobiana é uma das formas empregadas pelas bactérias probióticas para excluir, competitivamente, ou inibir a atividade das bactérias patogênicas no intestino. Assim vários microrganismos probióticos apresentam atividade antagonista contra espécies patogênicas pela síntese de bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos voláteis, ácido láctico e acético (SILVA et al., 2007).

Geralmente, esses ácidos orgânicos apresentam forte atividade inibitória contra bactérias Gram-negativas, pois a forma não dissociada do ácido orgânico penetra na célula bacteriana e se dissocia no citoplasma. A eventual queda do pH interno ou a acumulação intracelular da forma ionizada do ácido orgânico conduz à morte do

patógeno. Sendo assim a produção destes ácidos potencializa o efeito antimicrobiano e conseqüentemente o equilíbrio da microbiota intestinal (BALLUS et al., 2010).

Os probióticos estimulam a resposta imunitária através da ativação de macrófagos, por aumento dos níveis de citocinas e imunoglobulinas. No cólon podem alterar favoravelmente a microbiota e podem também melhorar a saúde urogenital. Têm também a capacidade para contrariar o desenvolvimento do carcinoma do cólon por estímulo da resposta imunitária do hospedeiro e ligação à compostos com potencial carcinogênico, por indução de alterações qualitativas e quantitativas da microbiota intestinal envolvidas na produção de compostos cancerígenos, por alteração das condições físico-químicas do cólon e por efeitos na fisiologia do hospedeiro (SANTOS, 2013).

Na maioria das vezes, os probióticos são selecionados utilizando-se bactérias da microbiota indígena, com a finalidade de se aumentar as chances de obtenção de bactérias com melhor capacidade adaptativa às condições intestinais do hospedeiro. Assim, um probiótico é capaz de metabolizar de forma mais rápida e eficiente os nutrientes, tornando-os indisponíveis aos patógenos e, conseqüentemente, impedindo a proliferação destes (ALVIM, 2011).

Outro benefício dos probióticos em relação ao trato gastrointestinal é no auxílio sintomático das cólicas abdominais, relacionadas com a motilidade anormal e a síndrome de intestino irritável, onde os probióticos interferem na regulação dos receptores opióides e canabióides das células epiteliais intestinais regulando a dor visceral (WENDLING; WESCHENFELDER, 2013).

5.2.4 Metabolismo das bactérias probióticas

O termo “probiótico” inclui uma ampla gama de bactérias do ácido láctico (BAL). As BAL são um grupo de bactérias que produzem ácido láctico como principal metabólito através da fermentação de carboidratos. São heterotróficas e têm necessidades nutricionais complexas (REDDY et al., 2008). Morfologicamente, as bactérias lácticas podem estar distribuídas em cocos, bacilos ou bastões regulares e bacilos ou bastões irregulares (MOZZI et. al, 2010).

De acordo com sua temperatura de crescimento as BAL podem ser classificadas em mesofílicas e termofílicas. Sendo que as mesofílicas são aquelas

que crescem a uma temperatura ótima por volta de 30 °C e as termofílicas aquelas que crescem a uma temperatura ótima de 42 °C (SYBESMA *et. al*, 2006).

As bactérias lácticas sobrevivem em presença de um pH relativamente baixo diferentemente de outros grupos microbianos com metabolismo respiratório. Esta característica é importante, pois capacita as BAL a eliminar competição da maioria de outras bactérias em ambientes ricos em nutrientes. As bactérias lácticas possuem ainda um sistema de transporte simultâneo de ácido láctico e prótons para o exterior celular, que contribuem para a homeostase do pH interno e originam energia (BERNARDEAU *et. al*, 2008).

As bactérias lácticas possuem elevadas exigências nutricionais em relação ao substrato, possuindo metabolismo fermentativo estritamente sacarolítico. Com base nos produtos finais da fermentação elas podem ser divididas em dois grupos: as homofermentativas e as heterofermentativas. As homofermentativas produzem ácido láctico como o principal produto da fermentação da glicose, enquanto que as heterofermentativas produzem, além de ácido láctico, substâncias como dióxido de carbono, ácido acético, etanol, aldeído e diacetil (GONÇALVES, 2009).

Dessa forma duas principais vias de fermentação de açúcar podem ser distinguidas entre as BAL (FIGURA 1). As homofermentativas utilizam em seu metabolismo a via glicolítica (via Embden-Meyerhof-Parnas) que resulta em ácido láctico como produto final. Já as heterofermentativas realizam a fermentação via 6-fosfogluconato/fosfoquetolase, que resulta em quantidades significativas de outros produtos finais, como o etanol, acetato, e CO₂ em adição ao ácido láctico produzido (GOMES, 2009).

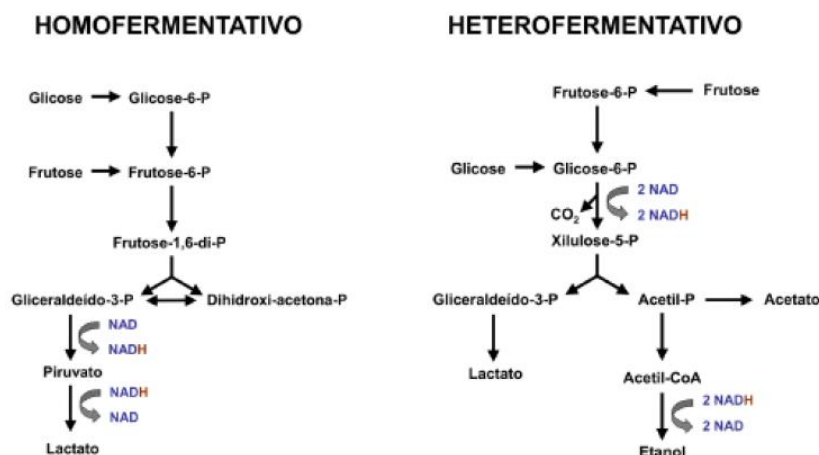


Figura 1. Representação esquemática simplificada das vias do metabolismo homofermentativo e heterofermentativo em bactérias lácticas.

Fonte: GOMES, 2009

Na indústria de alimentos, estas bactérias são de grande interesse pela capacidade de diminuir tanto o conteúdo de carboidratos dos alimentos que fermentam quanto o pH. Um dos efeitos mais desejáveis do seu crescimento é este processo de acidificação. O pH pode diminuir para um valor próximo de 4,0, valor baixo o suficiente para inibir o crescimento de várias bactérias, incluindo os patógenos mais comuns, prolongando, assim, a vida de prateleira desses alimentos. No entanto, em algumas situações, as BAL também podem ser responsáveis pela produção de sabores e aromas indesejáveis. A produção destes compostos indesejáveis ocorre devido estas bactérias serem tolerantes à temperaturas elevadas, ao baixo pH e por possuírem habilidade de crescimento extremamente rápida (REDDY et al., 2008).

As bactérias lácticas têm sido utilizadas em todo o mundo em várias fermentações de alimentos. Estas bactérias, não formam esporos, e assumem-se como Gram-positivas, ácido-tolerantes e catalase negativas (BALLUS et al., 2010).

As bactérias podem ser classificadas em dois grandes grupos: gram-positivas ou gram-negativas devido à técnica de coloração de Gram que foi desenvolvida em 1884, pelo bacteriologista dinamarquês Hans Christian Gram. As bactérias denominadas Gram-negativas (Figura 2) são aquelas que possuem parede celular mais complexa visto que possui uma maior quantidade de aminoácidos e de lipídeos, e se coram em rosa. As bactérias Gram-positivas são aquelas que possuem uma maior quantidade de peptídeoglicanas e se coram em roxo, e

possuem como por característica os ácidos teicóicos em sua estrutura (Figura 3) (FREITAS, 2007).

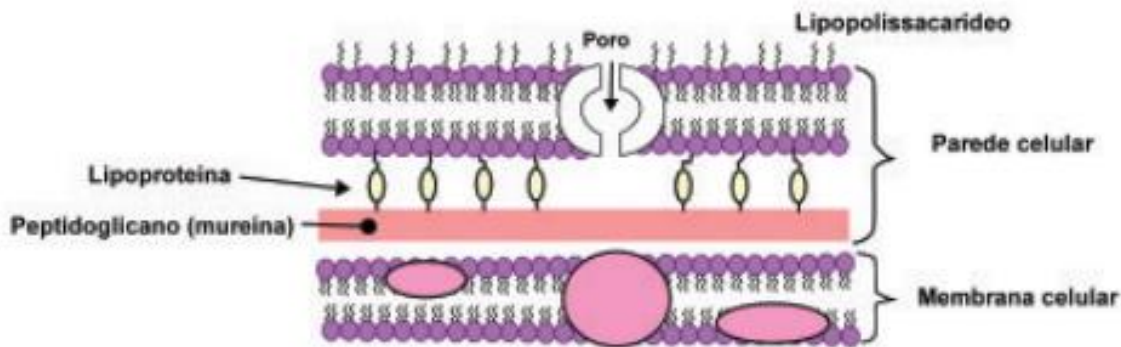


Figura 2. Estrutura básica da parede celular Gram – negativa.

Fonte: NOGUEIRA; MIGUEL, 2009.

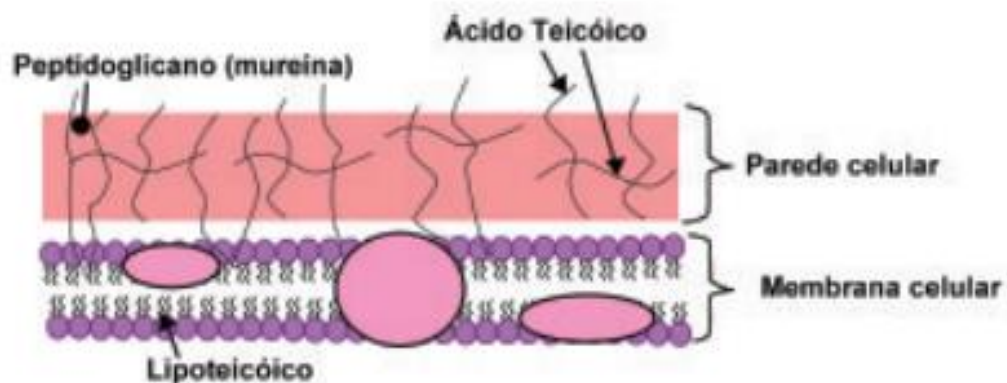


Figura 3. Estrutura básica da parede celular Gram – positiva.

Fonte: NOGUEIRA; MIGUEL, 2009.

A diferença de coloração de Gram se deve às diferenças na estrutura da parede celular de células gram-positivas e gram-negativas, que permitem que o álcool descore as células gram-negativas, mas não as gram-positivas. Os diferentes tipos de bactérias reagem de modo diferente à coloração de Gram, provavelmente porque diferenças estruturais em suas paredes celulares afetam a retenção ou liberação de uma combinação de violeta de genciana e iodo, denominada complexo violeta-iodo (CV-I). Entre outras diferenças, as bactérias gram-positivas têm uma parede celular mais espessa de peptidoglicano que as bactérias gram-negativas. Além disso, as bactérias gram-negativas contêm uma camada de lipopolissacarídeo como parte de sua parede celular, esta fração de LPS (lipopolissacarídeo) externa é

um fator de extrema importância na determinação da toxigenicidade e antigenicidade destas bactérias (NOGUEIRA; MIGUEL, 2009).

Quando aplicada às células gram-positivas e gram-negativas, a violeta de genciana e o iodo penetram facilmente nas células. Dentro das mesmas, a violeta de genciana e o iodo se combinam para formar o CV-I. Este complexo é maior que a molécula de violeta de genciana que penetrou na célula e, devido a seu tamanho, não pode ser removido da camada intacta de peptidoglicano das células gram-positivas pelo álcool (FREITAS, 2007).

Consequentemente, as células gram-positivas retêm a cor do corante violeta de genciana. Nas células gram-negativas, contudo, a lavagem com álcool rompe a camada externa de lipopolissacarídeo, e os complexos CV-I são removidos através da camada delgada de peptidoglicano. Como resultado, as células gram-negativas permanecem incolores até serem contra coradas com safranina, quando adquirem a cor rosa (FREITAS, 2007).

É sabido que os probióticos competem com as bactérias indesejáveis ao hospedeiro, pelos nutrientes disponíveis no nicho ecológico e ainda conseguem impedir a sua multiplicação através da produção de compostos antimicrobianos, nomeadamente as bacteriocinas. As bacteriocinas são definidas como substâncias produzidas por bactérias que são capazes de inibir a multiplicação de outras bactérias, mesmo em baixas concentrações. Atualmente, encontra-se na literatura uma ampla gama de trabalhos que descrevem a ação antagonista destas substâncias contra vários patógenos, tais como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, dentre outros (NOGUEIRA; GONÇALVES, 2011).

O peróxido de hidrogênio produzido pelos microrganismos probióticos é um antagonista cujo espectro de ação inclui a inibição do crescimento de bactérias patogênicas Gram negativo, sendo importante para a manutenção do equilíbrio da microbiota através do combate a bactérias patogênicas. Além disso, ele também pode estar associado à capacidade de colonização vaginal, impedindo o estabelecimento de patógenos nesta região. A ação bacteriostática dos ácidos formados é dependente do pH, sendo que quanto maior a redução deste, maior a quantidade de ácido e efeito antibacteriano mais intenso (NOGUEIRA; GONÇALVES, 2011).

As bactérias ácido lácticas produzem também nisina, diplococcina, lactocidina, bulgaricina e reuterina. Essas substâncias apresentam atividade inibitória, tanto para bactérias gram-negativas quanto para gram-positivas (NOGUEIRA; GONÇALVES, 2011).

Outra importante característica funcional das bactérias probióticas é a imunomodulação. A membrana que reveste o intestino é protegida por um sistema imunológico adaptativo. Alguns gêneros de bactérias intestinais, como o *Lactobacillus* e o *Bifidobacterium* estão diretamente relacionados com o estímulo da resposta imune por aumento da produção de anticorpos, ativação de macrófagos, proliferação de células T e produção de interferon, entre outros (WENDLING; WESCHENFELDER, 2013).

Para que os probióticos consigam influenciar na resposta imunológica, eles precisam ativar este tecido linfóide, que são as placas de Peyer e as células intestinais. Essas duas estimulam a comunicação dos linfócitos B e T com outros tecidos e são produtoras de imunoglobulina A (IgA). Dessa forma a resposta imunológica gerada é diretamente dependente da linhagem probiótica ingerida e do tipo celular ao qual ela se liga. A interação do microrganismo probiótico com as células dendríticas é o fator que promove a produção de citocinas, principais moléculas do complexo de histocompatibilidade principal para apresentação de antígenos, e moléculas co-estimulatórias que polarizam células T em células T regulatórias e auxiliares tipo 1 e 2. Além disso, bactérias probióticas podem atingir o tecido linfóide associado ao intestino atravessando células intestinais especiais (transcitose), chamadas células M, e interagir diretamente com as células dendríticas, modulando a resposta imune. Outro aspecto importante é que uma vez estabelecido no TGI, o probiótico promove o estímulo à proliferação de células T regulatórias e imunoglobulinas, principalmente IgA, em neonatos, permitindo um desenvolvimento normal do sistema imune por meio da indução da tolerância a antígenos luminiais, auxiliando na prevenção de doenças autoimunes e alergias alimentares (WENDLING; WESCHENFELDER, 2013).

Ao se aderir à mucosa estomacal e produzir substâncias bactericidas os probióticos impedem a colonização de *Helicobacter pylori* nas células epiteliais. Também atuam no sistema imunológico que auxilia na redução da inflamação das

células estomacais. Os probióticos não podem substituir o tratamento, mas podem auxiliar o esquema terapêutico de *Helicobacter pylori* (GUARNER, 2011).

Durante o processo de fermentação do iogurte, as vitaminas nele presentes fornecem substrato para o crescimento das bactérias lácticas e assim produzem mais vitaminas. As proteínas do leite são parcialmente pré-digeridas por ação as bactérias lácticas permitindo assim uma melhor digestão (VARAVALLO et al., 2008). As bifidobactérias presentes nos leites fermentados atuam na síntese das vitaminas no complexo B, vitamina K, ácido nicotínico e fólico, estimula o sistema imunológico e ajudam a restabelecer a microbiota normal após o uso de antibióticos (SANTOS et al., 2008).

A intolerância a lactose se manifesta devido à ausência da enzima β -galactosidase no intestino que impossibilita a degradação da lactose presente em alimentos como o leite. Para as pessoas intolerantes a lactose os leites fermentados são mais bem aceitos, pois a lactose presente no leite é reduzida durante a fermentação pelos lactobacilos e pelas bifidobactérias. Bactérias como *Lactobacillus acidophilus* encontradas em leites fermentados, também produzem essa enzima, o que possibilita que as moléculas de lactose presente no leite sejam clivadas em moléculas menores, facilitando sua digestão e beneficiando assim as pessoas com intolerância à lactose (WENDLING; WESCHENFELDER, 2013).

Considerando – se os efeitos benéficos na saúde do consumidor, a ANVISA determina a quantidade mínima viável para os probióticos entre 10^8 e 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Essa informação deve ser declarada no rótulo, próximo à alegação. Quanto à comprovação de eficácia, a documentação deve incluir o laudo de análise do produto que comprove a quantidade mínima viável do micro-organismo até o final do prazo de validade e o teste de resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e aos sais biliares (BRASIL, 2008).

Os probióticos são referidos como agentes bioterapêuticos e alimentos funcionais, mas antes de declarar o valor clínico desses micro-organismos disponíveis na indústria alimentícia é necessário avaliar com rigor os seus mecanismos de ação. O alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais e/ou de saúde, além de funções básicas, quando se tratar de nutriente, pode produzir efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou benéficos à saúde, devendo ser

seguro para consumo sem a supervisão médica. Para tanto devem, obrigatoriamente, ser registrados junto ao órgão competente (PEDROSO, 2011).

5.3 Probióticos e formulações alimentícias disponíveis no mercado

O aumento na procura por alimentos funcionais, como leites fermentados com culturas microbianas probióticas, elevou o interesse em pesquisas para manter estes micro-organismos viáveis no produto. As maiores populações de micro-organismos probióticos foram observadas nas bebidas com mais baixa acidez e elevado teor de sólidos. Culturas probióticas estão muitas vezes associadas a produtos lácteos fermentados. Iogurtes e alguns tipos de leite (leite fermentado) constituem os produtos mais comuns; Entretanto também podem ser considerados como probióticos outros alimentos como chucrute, pão, salame, alguns sumos e bebidas de soja (THAMER; PENNA, 2005).

Produtos à base de leite e dos seus derivados tem sido amplamente comercializados e atuam, geralmente, como bons substratos alimentares para os probióticos. Entretanto, o consumo destes alimentos tem sido limitado pela crescente onda de vegetarianismo e do grande número de pessoas intolerantes à lactose, alérgicas à proteína do leite ou que fazem dieta com restrição ao colesterol. O desenvolvimento de produtos não lácteos probióticos, incluindo matrizes alimentares à base de frutas, legumes e cereais, tem sido amplamente estudado como uma alternativa aos indivíduos e verificou-se que os alimentos fermentados tradicionais podem conter micro-organismos probióticos viáveis (VASUDHA; MISHRA, 2013).

Os alimentos probióticos são encontrados em várias apresentações: na forma de pó ou cápsulas para serem diluídas, formulações para animais, produtos farmacêuticos, alimentos de origem vegetal, produtos de confeitaria e produtos lácteos fermentados ou não (FERREIRA, 2003). A tabela 2 traz os principais produtos alimentícios comercializados no Brasil, contendo bactérias probióticas.

Tabela 2 - Principais produtos alimentícios probióticos comercializados no Brasil.

PRODUTO/ MARCA REGISTRADA	PROBIÓTICOS (MICRO - ORGANISMOS)	MERCADO/GÊNERO	APRESENTAÇÃO
Yakult/Yakult®	L.casei shirota	Alimentício	Bebida fermentada Sobremesa
Chamyto/Nestlé®	L. johnsonii L. helveticus	Alimentício	Bebida fermentada
Vigor Club-Pkemons®	L.casei L.acidophilus	Alimentício	Bebida fermentada
Batativo®	L.casei	Alimentício	Iogurte
LC1 Active Nestlé®	S. thermophilus L. bulgaricus L. acidophilus NCC 208	Alimentício	Iogurte
Iogurte Biofobras®	Bifidobacterium lactis L. acidophilus	Alimentício	Iogurte

Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, 2007.

5.4 Critérios utilizados na seleção dos probióticos

Diversas culturas probióticas vem sendo isoladas e caracterizadas, bem como o processo de fermentação passou a ser controlado e padronizado pelas indústrias. A adição de bactérias probióticas aos produtos probióticos exige uma série de cuidados. Uma das principais dificuldades encontradas está relacionada à funcionalidade, visto que os produtos são produzidos com uma base igual aos produtos não probióticos, para que não haja descaracterização e se assegure sua funcionalidade (VARAVALLO et al., 2008).

Durante o processamento de alimentos probióticos e após sua ingestão, as bactérias são submetidas a diversas condições estressantes: presença de ácidos orgânicos durante o cultivo (diminuição do pH), alta pressão osmótica, diminuição da atividade de água, alta concentração de íons, flutuações de temperatura, vácuo, liofilização, exposição ao oxigênio durante estoque prolongado, depleção de nutrientes, antagonismo entre linhagens, presença de compostos antimicrobianos (peróxido de hidrogênio e bacteriocinas), entre outros (VASIJEVIC & SHAH, 2008).

Dessa forma uma seleção adequada de estirpes deve ser conduzida para que o processamento dos gêneros classificados como probióticos ocorra de forma

adequada. Essa seleção visa garantir a sobrevivência desses micro-organismos à passagem pelo trato gastrointestinal - TGI, após a manutenção de sua viabilidade no próprio produto-alvo, durante a elaboração e o armazenamento, bem como conferir propriedades tecnológicas adequadas a esse produto (KOMATSU et al., 2008).

Os principais critérios de seleção de um micro-organismo como probiótico para aplicação industrial são: sua capacidade de propiciar efeitos benéficos ao hospedeiro; exercer atividade antagonista contra micro-organismos patogênicos; possuir boas propriedades tecnológicas de modo que possa ser produzido e incorporado em produtos alimentares sem perder a viabilidade e funcionalidade ou criar sabores e texturas desagradáveis, resistindo além de tudo durante sua estocagem e transporte; sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal, chegarem vivos e bioativos em seu local de ação; aderirem e colonizarem o trato, tolerando o baixo pH do suco gástrico, resistindo à ação da bile e das secreções pancreáticas, e mantendo-se ativos no intestino; possuir a capacidade de adesão à superfície da mucosa intestinal; apresentar distribuição uniforme na formulação dos alimentos; ter a eficácia comprovada por estudos científicos; ser de origem humana; não apresentar histórico de patogenicidade, nem associação a doenças (SANTOS, 2013).

A escolha de um sistema carreador adequado é fator fundamental no desenvolvimento de alimentos funcionais probióticos, pois a sobrevivência desses micro-organismos é afetada pelas características físico-químicas e fatores intrínsecos dos alimentos transportadores. Além disso, em relação às perspectivas de processamento de alimentos, é desejável que as estirpes sejam apropriadas para a produção industrial em larga escala e resistam a todas as condições de processamento. Na produção de um alimento probiótico, o produto final deve ter vida média variando de 15 a 30 dias. É necessário ainda que os micro-organismos permaneçam viáveis e em número elevado ($>10^6$ UFC/mL) durante a vida de prateleira (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

No processo de seleção de probióticos vários critérios devem ser observados como, a segurança dos micro-organismos, os seus aspetos funcionais e também os seus aspectos tecnológicos (SAAD, 2006).

5.4.1 Critérios de segurança

A segurança constitui o primeiro passo na seleção de estirpes probióticas e inclui a origem, a classificação (espécie e género) e a sua não virulência. A resistência aos compostos antimicrobianos e as toxinas produzidas pelas bactérias patogênicas presentes no intestino, assim como a resistência a substâncias utilizadas como antibióticos em formulações farmacêuticas representam também características que devem ser consideradas. Esta resistência pode ser intrínseca à bactéria ou adquirida. A resistência intrínseca ocorre naturalmente e pode ser considerada como uma característica da espécie, enquanto a resistência adquirida se deve a mutações genéticas ou à aquisição de genes de outras bactérias. A não transmissão destes genes constitui também outro aspeto importante a considerar em termos de segurança (ALVES, 2013).

5.4.2 Critérios de funcionalidade

Em termos funcionais devem ser considerados, a sobrevivência às condições gastrointestinais, ou seja, a tolerância ao ácido, fluido gástrico e sais biliares. A sua persistência, aderência às células epiteliais do intestino e subsequente colonização, a atividade antagonista frente a bactérias patogênicas e as propriedades antimutagénica e anticarcinogénica têm sido também sugeridas como requisitos para ação probiótica (ALVES, 2013).

Os micro-organismos probióticos têm sido incorporados numa variedade de produtos derivados do leite, iogurtes, queijos, gelados e sobremesas lácteas. No entanto, subsistem problemas relativos à sua baixa viabilidade no sistema gastrointestinal e no próprio alimento. O baixo pH do suco gástrico constitui uma barreira eficaz contra bactérias no trato gastrointestinal pelo efeito negativo na viabilidade celular e consequente prevenção da colonização bacteriana no intestino delgado; assim, a sobrevivência dos micro-organismos probióticos à passagem do estômago e correspondente tolerância ao ácido é um requisito fundamental (MENEZES, et al, 2013).

A bile, solução aquosa constituída por ácidos, colesterol, fosfolipídios e pigmentos, desempenha um importante papel na emulsificação, solubilização e digestão dos lipídeos. Considerado um solvente biológico, são reconhecidas as suas propriedades antimicrobianas, uma vez que as membranas das bactérias podem, por ela, ser dissolvidas. A hidrólise dos sais biliares tem sido identificada e caracterizada em bactérias probióticas, assumindo-se como um dos critérios para seleção de estirpes probióticas (SOARES et al., 2011).

A capacidade de aderência das estirpes probióticas à superfície intestinal e subsequente colonização constitui um requisito importante para que se verifique uma ação probiótica. Da aderência resulta uma interação entre a estirpe e a superfície da mucosa intestinal, promovendo os efeitos imunológicos e a exclusão competitiva de bactérias patogénicas (MENEZES, et al, 2013).

5.4.3 Critérios tecnológicos

Anteriormente à fase de colocação no mercado, as estirpes probióticas devem ser testadas quanto à capacidade de resistir ao processamento industrial e de sobreviver e manter a sua funcionalidade durante a fase de armazenamento. Paralelamente, a sua incorporação nos alimentos não deve transmitir sabores estranhos ou mesmo alterar a textura dos alimentos (SOARES et al., 2011).

5.5 Influências dos aspectos tecnológicos sobre as características e a viabilidade de culturas probióticas

5.5.1 Tolerância à acidez

A resistência à acidez e a tolerância aos sais biliares são duas propriedades fundamentais para que os micro-organismos sejam considerados probióticos, permitindo que sobrevivam às condições ácidas do estômago e a presença dos sais biliares no intestino delgado durante a passagem pelo trato gastrintestinal (BALLUS et al., 2010).

O pH final ideal é de aproximadamente 4,7. Esse pH deve ser alcançado em no máximo 24h para garantir a segurança microbiológica do produto durante sua vida útil e para evitar que o pH decresça a valores muito baixos durante o estágio de armazenagem. As bactérias probióticas têm baixa capacidade de acidificação, sendo utilizadas em associação com culturas bioajustadoras. Apesar do pH não ser o único fator envolvido no crescimento das bactérias probióticas, sua dificuldade de desenvolvimento em pH inferior a 4,5 limita a manufatura de produtos alimentares (MAZO et al, 2009).

5.5.2 Presença de oxigênio

O potencial de oxigênio é aumentado no intestino favorecendo o crescimento de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, como enterobactérias, enterococos e estafilococos, pois as bactérias anaeróbias não podem crescer inicialmente. À medida que as bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas consomem o oxigênio, o meio se torna favorável ao crescimento das bactérias anaeróbias obrigatórias como as Bifidobacteria, Bacteroides e Clostrídia, que começam a proliferar. Então os aeróbios e as bactérias facultativas diminuem, possivelmente devido à redução dos nutrientes passíveis de serem utilizados em meio com baixo potencial de oxigênio (MAZO et al, 2009).

Os micro-organismos probióticos são considerados como altamente susceptíveis ao oxigênio, embora essa tolerância dependa da espécie. O oxigênio pode afetar esses organismos pela sua toxicidade às células e pela produção de peróxido de hidrogênio (BALLUS et al, 2010).

Diversos micro-organismos probióticos são anaeróbicos por natureza, portanto elevado teor de oxigênio o pode afetar seu crescimento e viabilidade. O acúmulo de peróxido de hidrogênio é facilitada pelo fato de alguns micro-organismos não apresentarem a enzima catalase. O peróxido de hidrogênio pode reagir com outros compostos e produzir substâncias inibidoras. Os micro-organismos estritamente anaeróbios, geralmente são considerados mais vulneráveis aos efeitos deletérios do oxigênio. Para lidar com o problema da permeabilidade das embalagens plásticas ao oxigênio, uma das opções é o emprego de embalagens de vidro que são menos permeáveis (BALLUS et al, 2010).

Contudo, considerando as dificuldades inerentes a essa estratégia pode-se trabalhar com a adição de ácido ascórbico que atua como removedor de oxigênio. Além do ácido ascórbico, a adição de L-cisteína mostrou-se efetiva para o aumento da viabilidade de micro-organismos. A cisteína, aminoácido sulfurado, também pode servir como fonte de nitrogênio (fator de crescimento), bem como reduzir o potencial redox do meio. A adição de soro de queijo em pó e de concentrado de proteínas do soro pode afetar consideravelmente a viabilidade das bactérias, servindo como fontes de peptídeos e aminoácidos em função do tratamento térmico do leite durante o processamento do iogurte. As proteínas do soro são ricas em aminoácidos sulfurados, os quais são liberados durante o tratamento térmico e, assim, poderão diminuir o potencial redox do meio. As proteínas do soro também podem atuar como sistema tampão, evitando mudanças bruscas no pH. (BALLUS et al, 2010).

5.5.3 Presença de ingredientes e aditivos alimentares

Os aditivos alimentares são indispensáveis na fabricação de bebidas e outros derivados lácteos. Tornam-se parte do alimento a fim de estabelecer características sensoriais próprias e definidas, como sabor, aparência, consistência e vida útil. Há estudos que demonstram a influência de aditivos utilizados em produtos probióticos no crescimento dos iniciadores ácido-lácticos e das bactérias probióticas. Constataram que adoçantes, compostos aromáticos, natamicina, agentes flavorizantes e o flavorizante-corante de pêssego não influenciaram o crescimento das estirpes nas concentrações utilizadas pela indústria. O efeito de outras substâncias, especialmente agentes flavorizantes-corantes, mostrou-se dependente da espécie bacteriana. (MAZO et al, 2009).

Alguns aditivos comumente utilizados pela indústria de laticínios são: sais, açúcares, frutas, adoçantes, corantes, aromatizantes, nisina, natamicina e lisozima. Em geral, as bactérias probióticas são mais resistentes aos aditivos do que as culturas starters. Compostos como KCl, adoçantes (acesulfame e aspartame), compostos do aroma (diacetil, acetaldeído e acetoína), natamicina, aromatizantes (essências de morango, baunilha, pêssego e banana) e agentes corantes-aromatizantes (pêssego) não influenciaram o crescimento das linhagens nas concentrações comumente utilizadas na indústria de laticínios. A tolerância das

culturas starters e das bactérias probióticas aos aditivos deve constituir critério de seleção para possibilitar a melhor combinação de linhagens, melhorando o desempenho no crescimento e a viabilidade celular durante o processo industrial e a estocagem do produto (BALLUS et al, 2010).

5.5.4 Métodos de conservação das linhagens

Os probióticos devem ser mantidos bem refrigerados, pois normalmente têm pouco tempo de vida e ação. Algumas estirpes mostram sensibilidade à acidez e este problema é agravado pela pós-acidificação no armazenamento, promovido pela β -galactosidase que ainda permanece ativa de 0°C a 5°C (SOARES et al., 2011).

A sobrevivência destes micro-organismos no trato gastrointestinal humano é questionável, portanto a obtenção de probióticos que resistam à passagem por essa barreira é de grande interesse do ponto de vista nutricional e tecnológico. Condições extremamente ácidas como as encontradas no estômago podem diminuir significativamente o número de células probióticas viáveis que chegariam ao intestino (SANTOS, 2013).

A aplicação dos probióticos esbarra na dificuldade de elaboração de produtos que tenham boa resistência ao processamento e viabilidade durante a vida útil do produto, já que algumas estirpes são extremamente sensíveis (OLIVEIRA, 2011).

As bactérias probióticas possuem mecanismos de resposta ao estresse, sendo capazes de acumular substâncias compatíveis inertes que protegem suas enzimas contra a ação do calor, frio, desidratação e exposição ao ambiente gastrintestinal (VASIJEVIC & SHAH, 2008).

Existem recursos tecnológicos para aumentar a viabilidade dos microrganismos durante o processamento e estocagem. Dentre eles, destacam-se a adição de crioprotetores, prebióticos e o microencapsulamento das bactérias. A adição de crioprotetores tem por objetivo diminuir a diferença osmótica entre o interior e exterior das células, diminuindo os danos causados pelo frio. Os prebióticos contribuem para a viabilidade das bactérias uma vez que estimulam especificamente o seu crescimento. O microencapsulamento, por sua vez, consiste em envolver as bactérias probióticas em polímeros naturais, reduzindo as perdas

celulares durante o processamento e estocagem dos produtos (CAPELA et al, 2006).

5.5.5 Microencapsulação de probióticos

A microencapsulação é uma tecnologia que permite recobrir partículas ou pequenas gotas de material líquido ou gasoso, formando cápsulas em miniatura, as quais podem liberar seu conteúdo em taxas controladas e/ou sob condições específicas. Tais microcápsulas podem apresentar tamanho na faixa de frações de micron até vários milímetros, possuindo diferentes formas, dependendo dos materiais e métodos utilizados em sua preparação. O material externo é denominado agente encapsulante, enquanto ingrediente interno é o material ativo (MENEZES et al., 2013). A figura 4 mostra a estrutura física de uma microcápsula.

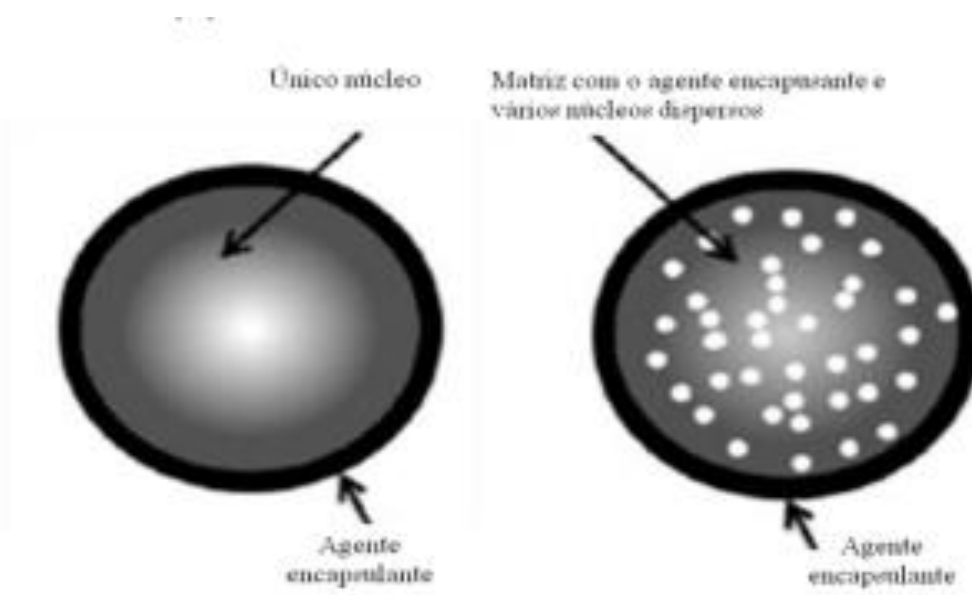


Figura 4. Representação da estrutura física de uma microcápsula.

Fonte: BURGAIN et al., 2011.

Este processo pode ser aplicado a culturas *starter* ou culturas de arranque com manutenção de viabilidade celular elevada e aumento, de forma eficiente, da resistência dos probióticos à passagem pelo trato gastrointestinal. Quando incorporadas em produtos alimentares, na forma de microcápsulas, as bactérias probióticas conservam a sua viabilidade até ao momento de consumo do produto.

Por outro lado, as células conseguem atingir a taxa de atividade metabólica celular desejável e mantêm as suas propriedades sensoriais permanecendo elevada e controlável a viabilidade das bactérias na fase final do processo de fermentação. Como desvantagem, a produção de produtos fermentados usando bactérias encapsuladas implica custos mais elevados, devido ao longo período de incubação que exige e à necessidade de uso de grandes quantidades de inóculo (uma vez que não há células de multiplicação durante o processo de fermentação) (ALVES, 2013).

A sua aplicação também é conhecida em processos de fermentação. Os micro-organismos são protegidos do efeito nefasto de compostos químicos alcançando uma boa rentabilidade na produção de metabolitos durante o processo fermentativo, como o caso do fabrico do iogurte, queijo e produtos lácteos congelados (ANAL E SINGH, 2007).

A microencapsulação de probióticos ajuda a fixar e/ou melhorar as propriedades sensoriais do produto final sendo a acidez de um produto fermentado por bactérias micro encapsuladas mais moderada. A inativação do metabolismo das bactérias encapsuladas conduz à fixação do sabor dos produtos não influenciando, portanto, o seu perfil de sabores especialmente durante o período de armazenamento (ALVES, 2013). Na tecnologia de microencapsulação são utilizados polímeros, tais como alginato, carragenina, goma, quitosano, amido e proteínas do soro de leite (SANTOS, 2013).

A microencapsulação tem sido aplicada pela indústria com o objetivo de melhorar a resistência das células probióticas no trato gastrointestinal e prolongar a sua vida útil em produtos alimentares. Enquanto o uso de crioprotetores e prebióticos aumenta a viabilidade das bactérias probióticas por até quatro semanas de estocagem a 4°C. O microencapsulamento desses microrganismos probióticos pode aumentar a viabilidade dos mesmos após seis meses de estocagem a temperaturas de 4 e 21°C (CAPELA et al, 2006).

No entanto, a tecnologia de microencapsulação de probióticos tem ainda de enfrentar muitos desafios para uma aplicação eficaz à escala industrial. Um dos desafios passa pela redução do tamanho das cápsulas, de forma a não afetar negativamente a textura e as propriedades sensoriais do produto. No processo de emulsão que utiliza óleo vegetal, há que se observar a presença de óleo residual na superfície das cápsulas que prejudica a textura e as propriedades sensoriais do

produto; além de dificultar a sua incorporação na dieta alimentar pode também tornar-se tóxico para as bactérias probióticas (SANTOS, 2013).

Diferentes técnicas podem ser usadas na microencapsulação de probióticos e cada uma delas fornece microcápsulas com diferentes características. A viabilidade bacteriana no produto depende da sobrevivência do probiótico aos processos de microencapsulação, do tipo e da concentração do material de revestimento, do tamanho das partículas, do número de células bacterianas iniciais e da estirpe bacteriana (CHEN; CHEN, 2007).

O tamanho das microcápsulas pode variar de microns até milímetros e parece influenciar na sobrevivência dos micro-organismos. As características ideais para um probiótico microencapsulado apresentar-se seria na forma de um pó seco, de armazenamento fácil e de vida de prateleira longa ou, então, um gel úmido com estabilidade a longo prazo (SIMEONE et al, 2014).

A microencapsulação deve promover as seguintes características mantendo a sua eficiência em relação ao meio externo: proteção contra luz, temperatura, umidade e oxigênio; liberação controlada e gradativa sob condições de pH; facilidade de manuseio e estocagem organismos (SIMEONE, 2014).

Um dos principais fatores que influencia a estabilidade do composto encapsulado é o tipo de agente encapsulante utilizado na microencapsulação. A escolha do agente se baseia nas características físicas e químicas do composto a ser encapsulado, moduláveis a ponto de produzir partículas com as características desejadas, com tamanho, estrutura, carga, permeabilidade e estabilidade adequadas para o tipo de aplicação pretendida (fármaco, aditivo alimentar, fragrância, pesticida) e no método de microencapsulação utilizado, além de apresentarem um mecanismo de liberação satisfatório, serem atóxicos e não possuírem reatividade com o material a ser encapsulado (FERNANDES, 2013).

5.5.6 Principais técnicas utilizadas na encapsulação de culturas probióticas

Diferentes técnicas podem ser usadas na microencapsulação de probióticos e cada uma delas fornece microcápsulas com diferentes características. A viabilidade bacteriana no produto depende da sobrevivência do probiótico aos processos de microencapsulação, do tipo e da concentração do material de revestimento, do

tamanho das partículas, do número de células bacterianas iniciais e da estirpe bacteriana (CHEN; CHEN, 2007).

O tamanho das microcápsulas pode variar de microns até milímetros e parece influenciar na sobrevivência dos micro-organismos. As características ideais para um probiótico microencapsulado apresentar-se seria na forma de um pó seco, de armazenamento fácil e de vida de prateleira longa ou, então, um gel úmido com estabilidade a longo prazo. Os métodos de microencapsulação de probióticos seguem quatro metodologias principais, que são: atomização ou *spray drying*, emulsificação, liofilização e extrusão (SIMEONE et al, 2014).

Portanto, a microencapsulação é uma alternativa válida para a obtenção de microcápsulas de baixo custo nas indústrias de alimentos. Dentre os diversos métodos de microencapsulação, o encapsulamento por *spray drying* e a *liofilização* são as metodologias mais empregadas, devido à grande disponibilidade de equipamentos, e à possibilidade de emprego de uma ampla variedade de agentes encapsulantes com estabilidade do produto final (SANTOS, 2013).

5.5.6.1 Spray Drying

A atomização por *spray drying* sé uma técnica relativamente barata, e a mais utilizada pela indústria de alimentos. A técnica de *spray drying* tem como características a produção de grande quantidade de material. Porém, existe um alto índice de perda de viabilidade dos micro-organismos, resultante da desidratação e inativação térmica das culturas probióticas. Em resposta a essas limitações, a técnica possui a vantagem de ser de alta viabilidade econômica e de alta capacidade de maleabilidade na técnica para melhorar a estabilidade das culturas probióticas (MENEZES, 2013). Na Figura 4 está representado esquematicamente o processo de *spray drying*.

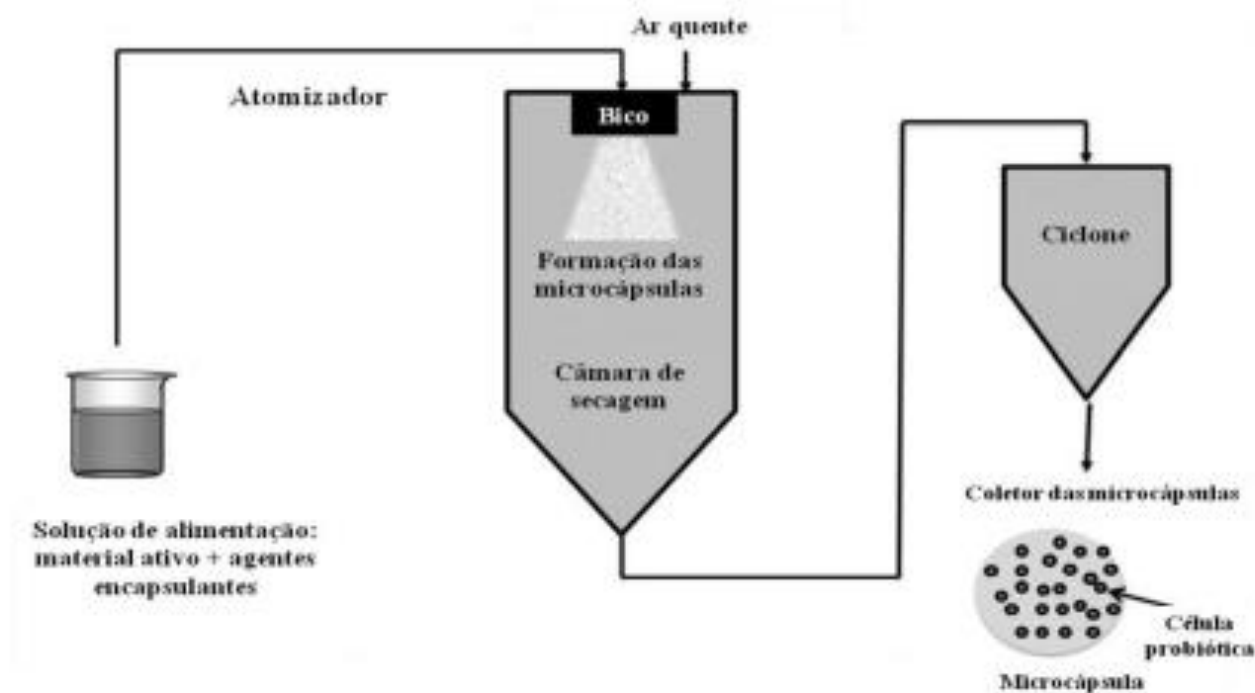


Figura 5. Representação esquemática do processo de spray drying.
Fonte: BURGIAN, et al, 2011.

A formação das microcápsulas por *spray drying* é resultado da rápida perda de umidade da gotícula aspergida pelo atomizador e formação de uma matriz rígida composta pelo agente encapsulante. O processo resulta em partículas esféricas devido à suspensão livre das gotículas líquidas no meio gasoso. Por outro lado, a eficiência na retenção do material ativo no núcleo está relacionada à parâmetros do processo (temperatura de secagem e tamanho de gotícula formada), características do agente encapsulante (tamanho das moléculas, solubilidade) e características do material ativo (polaridade, pressão de vapor, tamanho de molécula) (SOBRINHO, 2012).

Os agentes encapsulantes utilizados no método de *spray drying* devem possuir alta solubilidade em água, baixa viscosidade a altas concentrações e serem emulsionantes eficientes. Estes autores relatam ainda que a seleção dos agentes encapsulantes para microencapsulação por *spray drying* tem tradicionalmente envolvido procedimentos de tentativa e erro. Assim, a medida que as microcápsulas são produzidas, avaliações do rendimento da microencapsulação, das propriedades físicas, da estabilidade ao longo do armazenamento e do comportamento de liberação *in vitro* tornam-se necessárias (FERNANDES, 2013).

Os polímeros encapsulantes mais utilizados nessa técnica são a goma arábica e o amido, pelo fato que tendem a formar micropartículas esféricas durante o processo de secagem. Em contrapartida, há uma perda de viabilidade dos micro-organismos bastante acentuada nesse processo, resultante da temperatura e da desidratação, utilizadas na técnica. Para aumentar a viabilidade bacteriana podem ser utilizados agentes termoprotetores como amido, fibra solúvel e trealose, que são adicionados no meio antes da secagem. Esse método é altamente reprodutível e apropriado para aplicações industriais (FERNANDES, 2013).

Devido à sua versatilidade e ao pequeno tempo de residência dos produtos na câmara de secagem, o *spray drying* tornou-se um importante método para a microencapsulação de materiais que apresentam sensibilidade ao calor, como os micro-organismos. Entretanto o controle da temperatura de saída das microcápsulas da câmara de secagem do equipamento é de extrema importância, uma vez que este é o parâmetro que mais influencia na taxa de sobrevivência dos micro-organismos durante o processo (SOBRINHO, 2012).

5.5.6.2 Liofilização

A liofilização também denominada por outras nomenclaturas como criodesidratação ou criosecagem, é um processo diferenciado de desidratação de produtos e vem sendo utilizada como um processo alternativo para encapsular probióticos, uma vez que não requer baixas temperaturas durante o transporte não havendo também riscos associados à descongelação. Esta técnica não sendo um processo contínuo envolve, no entanto, um elevado custo de operação. No congelamento pode haver lugar à formação de cristais de gelo que danificam as membranas celulares das bactérias (ALVES, 2013).

A liofilização ocorre em condições especiais de pressão e temperatura, possibilitando que a água previamente congelada (estado sólido) passe diretamente ao estado gasoso (sem passar pelo estado líquido), ou seja, a mudança de estado físico ocorre por sublimação. Dessa forma é utilizado com o fim de reduzir as perdas dos componentes voláteis ou termosensíveis. A liofilização também pode ser definida como sendo um processo de estabilização, no qual a substância é

primeiramente congelada e, depois, a quantidade de solvente é reduzida por sublimação seguida da dessorção, com o objetivo de garantir que não há apoio para o crescimento biológico ou reações químicas. É o mais nobre processo conhecido de conservação de produtos biológicos, porque reúne os dois métodos mais viáveis de conservação, a congelação e a desidratação (RIBEIRO, 2012). Na Figura 5 está representado esquematicamente o processo de *spray drying*.

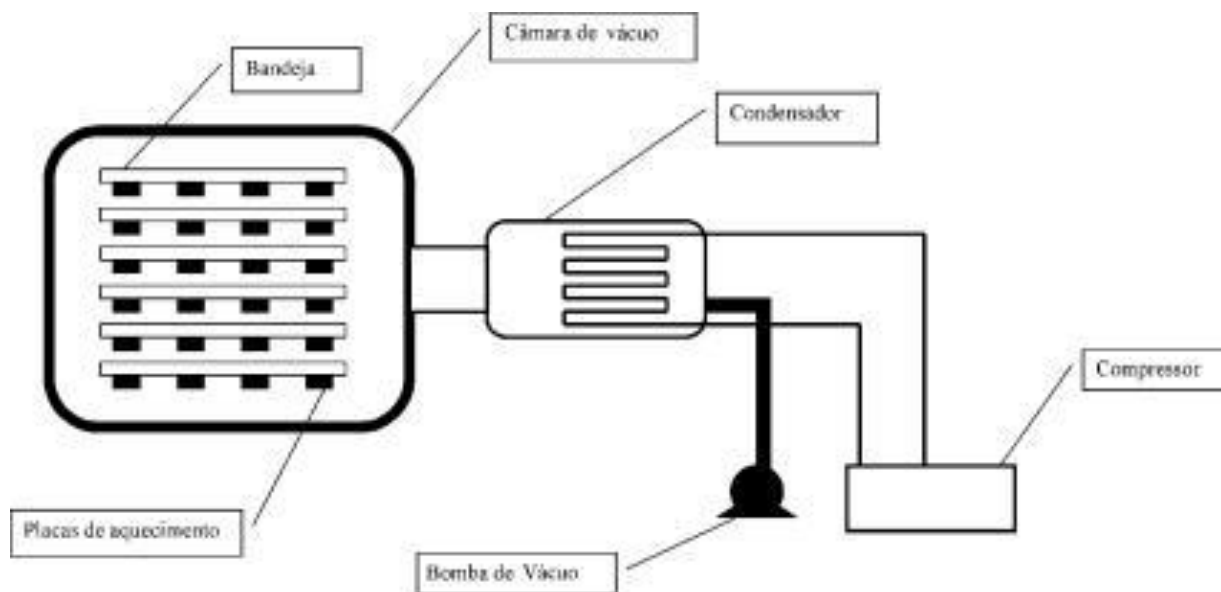


Figura 6. Representação esquemática do processo de micro-encapsulação pelo método de liofilização.

Fonte: BURGIAN, et al, 2011.

Usualmente, na prática da liofilização, a temperatura do produto congelado deve ser mantida bem abaixo de 0 °C. Assim, para ser possível a realização de uma liofilização é preciso que o produto esteja previamente congelado, haja uma fonte de calor, câmara de vácuo e que exista um sistema de condensação que opere a temperaturas inferiores à do produto congelado (RIBEIRO, 2012).

É um processo caro, que necessita da aplicação de tratamentos prévios adequados e consiste em duas etapas, a saber: Congelamento rápido do produto e sublimação do gelo sob vácuo. Um processo de encapsulação pode ser realizado por meio de liofilização de uma emulsão do material do núcleo com um encapsulante. O método gera produtos de excelente qualidade, uma vez que minimiza as alterações associadas a altas temperaturas (SIMEONE, 2014).

A encapsulação por liofilização resulta em menor degradação de b-caroteno durante o processo, quando comparada à atomização por *spray drying*. Por outro

lado, seu alto custo e longo tempo de processo prejudicam sua aplicabilidade comercial (ALVES, 2013).

5.5.6.3 Emulsificação

A emulsificação é um método químico utilizado para encapsular bactérias probióticas e utiliza como base as seguintes matrizes: hidrocolóides como alginato, carragena e pectina (MENEZES et al., 2013).

O princípio dessa técnica é baseado na relação entre a fase descontínua (solução encapsulante com células probióticas) e a fase contínua (óleo). Para encapsulação em uma emulsão, um emulsificante e um surfactante são necessários, além de um agente solidificante (cloreto de cálcio) que é adicionado à emulsão. A mistura é homogeneizada para formar uma emulsão água em óleo. Formada a emulsão, o polímero solúvel em água deve ser insolubilizado para formar pequenas partículas de gel dentro da fase de óleo. As microcápsulas são recuperadas por filtração ou centrifugação (SIMEONE, 2014).

A técnica de emulsificação é de fácil realização e apresenta uma alta taxa de sobrevivência das células bacterianas. É possível obter cápsulas de diâmetro reduzido, no entanto, a principal desvantagem dessa técnica é que não há uma padronização no tamanho e formato das microcápsulas. Fatores como velocidade de agitação da emulsão, quantidade de agente solidificante usado e concentração do surfactante também têm um efeito sobre o tamanho das gotículas da fase dispersa, que, eventualmente, influenciam o tamanho das microcápsulas (CHEN; CHEN, 2007). Na Figura 6 está representado o processo de microencapsulação por emulsificação.

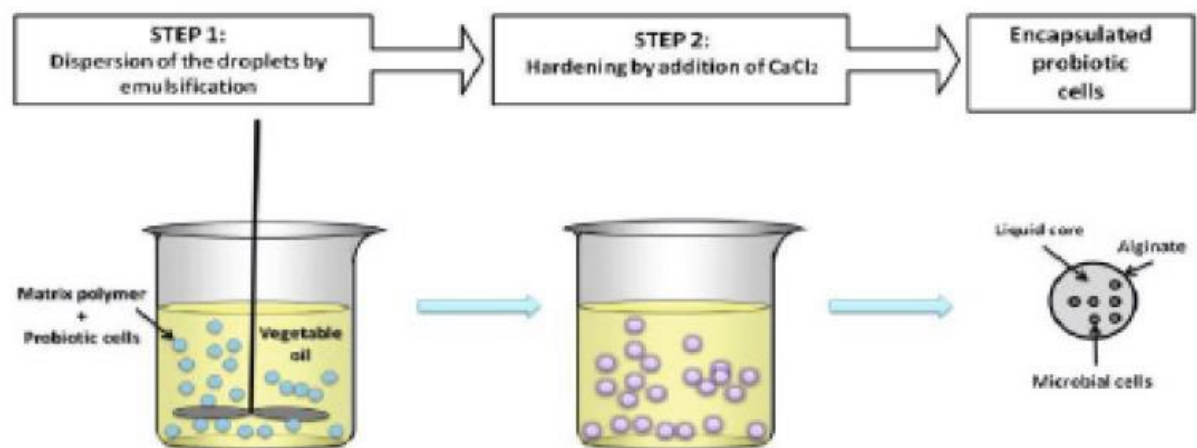


Figura 7. Representação esquemática do processo de microencapsulação por emulsificação.
Fonte: BURGIAN, et al, 2011.

5.5.6.4 Extrusão

A encapsulação por extrusão é um método particularmente útil para compostos termolábeis, que envolve a dispersão do material do núcleo em uma massa fundida de um carboidrato. Esta técnica se diferencia da técnica de emulsificação por se tratar de um processo físico e não químico. Entretanto as duas técnicas usam como base para encapsulação de probióticos as matrizes, hidrocolóides, geralmente alginato, pectina e carragena. Tal técnica consiste em projetar esse material através de um bocal de alta pressão, que irá gotejar em uma solução contendo cloreto de cálcio, para que ocorra a solidificação por gelatinização iônica. Nesse processo, o cálcio difunde-se para o interior das gotas de alginato (MENEZES et al., 2013).

A extrusão é um processo que não causa danos às células bacterianas, conferindo maior viabilidade dos micro-organismos encapsulados em comparação ao método de spray drying. É uma técnica simples e barata, mas possui a desvantagem de ser de difícil aplicação em grande escala industrial, devido à formação das microcápsulas ser muito lenta (SIMEONE et al, 2014). Na Figura 7 está representado o processo de microencapsulação pelo método de extrusão.

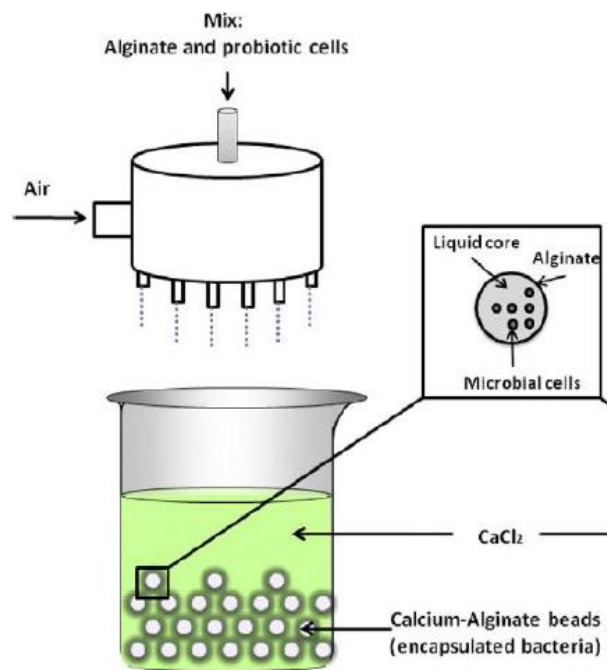


Figura 8. Representação esquemática do processo de microencapsulação pelo método de extrusão.
Fonte: BURGIAN, et al, 2011.

6 CONCLUSÃO

Os probióticos são microrganismos que promovem melhoria à saúde de quem os utiliza, bem como, promovem prevenção de inúmeras doenças. A seleção dos produtos feita pelos consumidores têm sido cada vez mais exigente e mais desperta para níveis de qualidade elevados, tornando o seu comportamento um dos aspectos mais importantes a se considerar. Deste modo, o desenvolvimento de novos alimentos funcionais tornou-se um grande desafio, que tem obrigado às indústrias alimentícias a dispor de tecnologias que sejam economicamente viáveis e passíveis de serem utilizadas em escala industrial.

Dessa forma vários estudos têm sido centralizados nos processos utilizados durante a industrialização dos produtos alimentícios, avaliando quesitos como o prolongamento da viabilidade e a sobrevivência das culturas probióticas frente às situações adversas, como, principalmente, em condições de baixo pH e elevadas concentrações de sais biliares, as quais os micro-organismos probióticos são expostos durante a sua produção, seu armazenamento e/ou a sua passagem pelo trato gastrointestinal.

A utilização dos processos de microencapsulação de probióticos através das técnicas de liofilização e Spray-drying têm sido as principais alternativas utilizadas para solucionar os problemas que esses micro-organismos encontram no processamento de alimentos. Contudo, existem diversos desafios a serem enfrentados na utilização dessas tecnologias. Sendo de extrema importância que sejam estudados o efeito dos alimentos probióticos, e não apenas o efeito das bactérias probióticas isoladamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M. S. **Microencapsulação de bactérias lácticas com potencial probiótico para produção de pasta de azeitona.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar/Qualidade Alimentar) - Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade de Lisboa. Lisboa. 70 f, 2013.

ALVIM, L. B. **Identificação molecular e seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico isoladas de diferentes mucosas de suínos.** Dissertação. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 96 f., 2011.

ANAL, A. K., SINGH, H. **Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and target delivery.** Trends in Food Science and Technology, v. 18, n. 5, p. 240–251, 2007.

BADARÓ, A. C. L., et al. **Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana—parte 2.** Revista digital de nutrição, Ipatinga, v. 3, n. 4, p. 396-416, 2009.

BALLUS, C. A., et al. **Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na elaboração de produtos lácteos fermentados: Revisão.** Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, Curitiba, v. 28, n. 1, p. 85-96, 2010.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária, ANVISA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas.** 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA, **Resolução nº 18.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. **IX-Lista de Alegações de Propriedade Funcional Aprovadas**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2008.

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

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

CHEN, M. J., CHEN, K. N. **Applications of probiotic encapsulation in dairy products**. In: Lakkis, Jamileh M. Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems. Wiley-Blackwell, USA. p. 83–107, 2007.

FAO/WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Report of a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. London, Ontario, Canada, 2002.

FERNANDES, G. R. **Aplicações Tecnológicas Atuais e Potenciais No Mercado Para Alimentos Probióticos**. Dissertação (Bacharel em Biosistemas) - Universidade Federal de São João Del Rey. Sete Lagoas. 43 f. 2013.

FERREIRA, C.L.L. **Prebióticos e Probióticos: atualização e prospecção**. Viçosa: UFV, p.7-33, 2003.

FREITAS, V. R.; PICOLI, S. U. **A Coloração de Gram e as Variações na sua Execução**. Newslab, 2007.

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

GOMES, F.S. **Antagonismo entre leveduras e bactérias lácticas na fermentação alcoólica**. 2009. 171 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Sorocaba, 2009.

GUARNER, F.; et al. **Diretrizes mundiais da organização mundial de gastroenterologia: guias práticas probióticos e prebióticos**. 29 p, 2011.

HAVENAAR, R.; BRINK, T.; HUIS IN'T VELDT, J. H. J. London: **Chapmann and Hall**, p. 209-224, 1992.

HUNGRIA, T. D.; LONGO, P. L. **Viabilidade de *Lactobacillus casei* em alimento probiótico infantil relacionada a vida de prateleira**. Revista Saúde, Guarulhos, v. 3, n. 3, p. 10-15, 2009.

KOMATSU, T.R; BURITI, F.C.A; SAAD, S.M. I. **Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos**. Rev. Bras. Ciênc. Farm., São Paulo , v. 44, n. 3, Sept. 2008.

MAZO, J. Z., et al. **Bifidobactérias: Isolamento, Identificação e Aplicação em Alimentos Probióticos**. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos 27, nº. 1, 2009.

MENEZES, C. R., et al, **Microencapsulação de probióticos : avanços e perspectivas**. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, v.43, n.7, p.1309-1316, 2013.

NOGUEIRA, J. C. R.; GONÇALVES, M. C. R. **Probióticos-Revisão da Literatura**. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, v. 15, n. 4, p.487-492, 2011.

OLIVEIRA, D. L. P. **Produção e avaliação de micropartículas lipídicas contendo *Lactobacillus acidophilus* ou *Bifidobacterium lactis* produzidas por spray chiling**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade de São Paulo (USP). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. 76 f. Pirassununga. 2011.

PEDROSO, S. H. S. P. **Ação probiótica da levedura *Saccharomyces boulardii***. Dissertação (Especialista em Microbiologia Aplicada às Ciências Ambientais e Industriais) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 102 f. 2011.

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

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

SANDERS, M.E., et al. **Probiotics: Their Potential to Impact Human Health**. CAST issue paper, n. 36, 2007.

SANTOS, R. C. S. **Microencapsulação De Lactobacillus Casei Por Spray Drying**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil, 104 f. 2013.

SIMEONE, C. P. et al. **Microencapsulação de Probióticos: Inovação Tecnológica Na Indústria De Alimentos**. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas - UFSM, Santa Maria. - v. 18. Ed. Especial Mai. 2014, p. 66-75.

SOARES, D. S.; et al. **Aproveitamento de soro de queijo para produção de iogurte probiótico**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 63, n. 4, p. 996-1002, 2011.

SOBRINHO, E. C. S; FARIAS, M. C.; **A Microencapsulação Na Indústria Alimentícia**. INFARMA v.24, nº 1-3, 2012.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. **Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, v. 41, n. 03, 2005.

VARAVALLO, M. A; et al. **Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais.** Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 29, n. 1, p. 83-104, 2008.

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

VASUDHA, S; MISHRA, H. N. **Non dairy probiotic beverages.** Int Food Res J, v. 20, p.7-15, 2013.

WENDLING, L. K; WESCHENFELDER, S. **Probióticos E Alimentos Lácteos Fermentados - Uma Revisão.** Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 68, n. 395, p. 49-57, 2013.