

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
NÚCLEO DE NUTRIÇÃO

Nízia Mayra de Oliveira

ENCAPSULAÇÃO DE *BIFIDOBACTERIUM LACTIS* E SUA TOLERÂNCIA A
FLUIDOS SIMULADOS DO TRATO GASTROINTESTINAL

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO/PE
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
NÚCLEO DE NUTRIÇÃO

ENCAPSULAÇÃO DE *BIFIDOBACTERIUM LACTIS* E SUA TOLERÂNCIA A
FLUIDOS SIMULADOS DO TRATO GASTROINTESTINAL

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Nutrição como requisito para
conclusão do Curso de Bacharel em
Nutrição

Estudante: Nízia Mayra de Oliveira
Orientador: Prof^a Dr^a Christine
Lamenha Luna Finkler

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO/PE
2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais João Monteiro de Oliveira e Vaurilene Maria de Oliveira, pelo amor incondicional, paciência, incentivo e por me ensinarem a ter força de vontade para atingir meus objetivos. Obrigada pela confiança, carinho e tudo que fizeram por mim para realização de mais este sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que nos deu a vida e sempre me iluminou em minhas escolhas e por me fazer vencer cada obstáculo durante esse trajeto. Obrigada Senhor por sempre olhar por mim com tanto amor e atenção.

Agradeço aos meus pais principais incentivadores em busca desse sonho, mesmo a distância sendo necessária, sempre estiveram presentes através de telefonemas com palavras de apoio e encorajamento nos momentos mais difíceis. Se consegui chegar até aqui hoje é graças ao amor de vocês.

Agradeço ao meu avô Severino Monteiro, que tanto me apoiou e me ajudou durante esse período, é, sua Nilzinha chegou lá. Vou continuar lutando, para sempre merecer esse orgulho que o senhor tem de mim.

Agradeço ao meu Grande Amor Ivonaldo Fábio, pelo companheirismo e principalmente pela compreensão durante os vários momentos em que precisei estar ausente, obrigada por me entender e ajudar durante todo esse período. Sem seu amor, carinho, atenção e paciência teria sido muito mais difícil.

Agradeço as minhas tias Marily e Maria pelo apoio religioso, podem ter certeza de que suas orações foram imprescindíveis para essa conquista.

Agradeço a Janilton (Jan), companheiro mais que fiel, com quem caminhei durante toda essa jornada. Obrigada pela sua companhia durante noites, madrugadas, dias, no laboratório tenho certeza que sem você teria sido insuportavelmente mais difícil. És o irmão que a vida me deu torço muito por você, e tenho certeza que realizarás todos teus sonhos, nunca conheci alguém tão determinado como você.

Agradeço a Elaine (Lalazinha) minha irmãzinha de coração, por ser essa alegria em pessoa, nunca conheci alguém com um astral tão bom e contagiante como o seu, obrigada por me contagiar em tantos momentos difíceis me fazendo rir e mostrando como a vida pode ser bem mais bela, com esse teu jeito único irás muito longe menina e serás uma profissional como poucas.

Agradeço Joelma (Joba) foi sintonia desde o primeiro momento, nos demos bem e construímos uma linda amizade, seu jeito sério e centrado, vai te levar

muito mais além do que você imagina. Obrigada por colocar a ordem na bagunça, quando era necessário.

Agradeço a Juliana de Castro (Juli), por me mostrar como ser uma verdadeira profissional, estudiosa e inteligente como poucos vais muito longe japonesinha.

Agradeço a Barbara (Bazinha), por me ouvir quando queria desabafar, apesar de ser um bebê sabe aconselhar como ninguém, através de seu jeito calmo e tranqüilo me ensinaste muita coisa branquelinha.

Agradeço a Eloysa (Lola), que caiu de pára-quadras em nossas vidas e rapidamente nos conquistou, com seu jeito único de falar e com um coração tão grande e lindo que não cabe no peito. Obrigada por ter aparecido.

Agradeço ao Prof^o Dr^o José Cândido Ferraz Júnior, que foi meu primeiro orientador, com você aprendi a dar os primeiros passos na vida acadêmica, e amadurecer como profissional. Obrigada pela paciência, amizade e carinho de sempre.

Agradeço a minha orientadora Prof^a Dr^a Christine Lamenha Luna Finkler, pela confiança, amizade e incentivo para realização deste trabalho, profissional como poucas, de uma humildade e sabedoria superiores, muito obrigada pelos valiosos conhecimentos passados.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Bromatologia, Renata, Elidiane, Elizandra, Gabriel, Ana Karina, Edilene, Hebe, Aline, Carina, Gabriella, Francis e Cibele pelo companheirismo em todos os momentos.

Agradeço aos Técnicos de Laboratório, Danúbia, Silvio, Michele, Marcela, Dewson, Renato, Rafael, Urevan e Sidcléia, pelos valiosos ensinamentos passados.

Agradeço a auxiliar de serviços gerais Ana, por deixar nosso laboratório sempre tão limpo e organizado, mas também por sua simpatia sem igual.

Agradeço a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro.

Agradeço aos demais amigos e a todos que de alguma forma torceram e contribuíram para esta conquista.

Muito Obrigada!

EPÍGRAFE

Se você quiser atingir uma meta especial, terá que estudar no horário em que os outros estão tomando *chopp* com batatas fritas. Terá de planejar, enquanto os outros permanecem à frente da televisão. Terá de trabalhar enquanto os outros tomam sol à beira da piscina. A realização de um sonho depende de dedicação. Há muita gente que espera que o sonho se realize por magia, mas toda magia é ilusão, e a ilusão não tira ninguém de onde está. Em verdade, a ilusão é combustível dos perdedores.

(Roberto Shinyashiki)

RESUMO

Probióticos são microorganismos vivos que quando ingeridos em quantidades adequadas, promovem benefícios à saúde do hospedeiro por meio do balanceamento da microbiota intestinal. Entre os microrganismos que são considerados como probióticos destaca-se *Bifidobacterium animalis* subspécie *lactis*. O objetivo do presente trabalho foi cultivar células de *B. lactis* e avaliar a tolerância das células livres e encapsuladas a fluidos simulados do trato gastrointestinal. Inicialmente, foram realizadas fermentações em meio caldo MRS (cultivos estacionário ou agitado; concentrações de inóculo de 1 e 5% v/v). A melhor condição de produção de células obtida neste ensaio foi utilizada para a fermentação em meio à base de soro de leite nas condições de 40%, 70% e 100% (v/v). Em seguida, as células foram submetidas a dois processos de encapsulação: imobilização por oclusão utilizando alginato de cálcio (1% p/v) na proporção células/alginato 1:4; e encapsulação em lipossomas contendo lecitina de soja como lipídio. Testes em condições simuladas do trato gastrointestinal em diferentes condições de pH e contendo pepsina, pancreatina e bile foram realizados com as células livres e encapsuladas em lipossomas. O melhor resultado de crescimento celular em caldo MRS foi observado na condição de 5% de inóculo a 50 rpm, enquanto que a melhor condição de fermentação em soro de leite foi obtida para 100% de concentração volumétrica de soro. O encapsulamento em alginato de cálcio demonstrou que a concentração de células viáveis diminuiu de $2,20 \times 10^8$ UFC/mL na suspensão células/alginato para $8,30 \times 10^5$ UFC/g nas microcápsulas. Após 20 dias, ocorre perda total da viabilidade das células encapsuladas. O processo de encapsulação em lipossomas foi mais eficiente, atingindo uma concentração de células viáveis na suspensão lipossomal de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Os testes de simulação em condições do trato gastrointestinal com as células encapsuladas sugerem que no primeiro estágio (presença de pepsina a pH 2,0) as células ficam em estado de latência após exposição por 2 h, não sendo detectada viabilidade celular. Após os estágios sucessivos na presença de pancreatina e bile (pH 8,0), ocorre uma pequena recuperação da viabilidade após um período total de ensaio de 6 h.

Palavras-Chave: Alginato de cálcio. *B. lactis*. Encapsulação. Lipossomas. Probióticos. Tolerância.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Aspecto morfológico de *B. lactis* (Fonte: http://www.beactiviahealth.com/html_cap/activia.html) 15
- Figura 2: Ilustração de uma vesícula lipossomal contendo um ingrediente ativo(Fonte: <http://www.srbrasil.com/lipossomas.html>) 19
- Figura 3: Desenho de estudo empregado no trabalho 24
- Figura 4: Formação do gel de alginato de cálcio por engaiolamento (FONTE: COVIZZI et al.,2007) 29
- Figura 5: Procedimento de imobilização por gotejamento (A) e aspecto visual das partículas formadas (B) durante a imobilização de *B. lactis* utilizando alginato como agente encapsulante 30
- Figura 6: Aspecto visual das partículas secas contendo células imobilizadas de *B. lactis* pelo procedimento de imobilização com alginato 31
- Figura 7: Evaporador rotativo a vácuo utilizado no preparo de lipossomas contendo *B. lactis* 32
- Figura 8: Jarras de anaerobiose usadas para incubação das placas..... 32
- Figura 9: Aspecto visual das soluções utilizadas no ensaio de tolerância 34
- Figura 10: Variação da absorbância durante o cultivo de *B. lactis* em meio caldo MRS nas condições de cultivo estacionário e agitado a 50 rpm e com concentrações de inóculo de 1 e 5% (v/v) 35

Figura 11: Variação do pH durante o cultivo de <i>B. lactis</i> em meio caldo MRS nas condições de cultivo estacionário e agitado a 50 rpm e com concentrações de inóculo de 1 e 5% (v/v)	36
Figura 12: Variação da absorbância durante o cultivo de <i>B. lactis</i> de acordo com o percentual de soro de leite no meio de cultivo	37
Figura 13: Variação do pH durante o cultivo de <i>B. lactis</i> de acordo com o percentual de soro de leite no meio de cultivo	38
Figura 14: Concentração de células viáveis durante o cultivo de <i>B. lactis</i> em meio à base de 100% de soro de leite	39
Figura 15 - Microcapsula de alginato de cálcio visualizada em microscopio optico com aumento de 1000x	40
Figura 16: Cinética de perda de umidade de partículas de alginato contendo células imoblizadas de <i>B. lactis</i> (massa inicial de partículas úmidas de 5 g)	41
Figura 17: Células de <i>B. Lactis</i> encapsuladas em lipossomas.....	42
Figura 18: Sobrevivência de células de <i>B. lactis</i> encapsuladas em lipossomas durante o ensaio de tolerância a fluidos simulados do trato gastrointestinal	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição do meio caldo MRS	27
Tabela 2: Composição do meio à base de soro de leite	27
Tabela 3: Composição centesimal do soro de leite empregado nos cultivos de <i>B. lactis</i>	37
Tabela 4: Concentração de células viáveis de <i>B. lactis</i> de acordo com a amostra nos ensaios de imobilização com alginato	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CVB - Caldo Verde Brilhante
EMB - Eosina Azul de Metileno
GUV - Giant Unilamellar Vesicles
LUV - Large Unilamellar Vesicles
MRS - DE MAN, ROGOSA e SHARPE
p/v - Peso por Volume
pH - Potencial Hidrogeniônico
rpm - Rotação por Minuto
SUV - Small Unilamellar Vesicles
TGI - Trato Gastrointestinal
UFC - Unidade Formadora de Colônia
v/v - Volume por Volume

LISTA DE SÍMBOLOS

® - Marca Registrada

μL - microlitros

μm - micrômetro

g - grama

h - hora

L - Litro

M - Molar

mg - Miligrama

min - Minuto

mL - Mililitro

nm - Nanômetro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	12
MARCO TEÓRICO.....	13
JUSTIFICATIVA	20
OBJETIVOS	21
OBJETIVO GERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
HIPÓTESES	22
METODOLOGIA	23
ÁREA.....	23
OBJETO DE ESTUDO E GRUPOS DE ESTUDO	23
PERÍODO DE REFERÊNCIA	23
DESENHO DO ESTUDO	23
DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS	24
MÉTODO DE COLETA DE DADOS	25
MÉTODOS DE ANÁLISE	25
ASPECTOS ÉTICOS	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXO	49

INTRODUÇÃO

CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

Atualmente os consumidores estão cada vez mais interessados em alimentos que tragam uma nutrição equilibrada e sejam capazes de prevenir certas doenças. Neste contexto, destacam-se os alimentos funcionais, estando entre eles os probióticos. Probióticos podem ser definidos como microrganismos vivos, presentes em certas concentrações nos alimentos, que, quando ingeridos, exercem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (Madureira et al. 2005). Entre as bactérias probióticas estão as do gênero *Bifidobacterium*, sendo que a espécie *B. Lactis* é uma das mais utilizadas em produtos alimentícios.

Quando expostas ao suco gástrico, enzimas digestivas e sais biliares, as bactérias probióticas podem perder a sua viabilidade. Isto porque o baixo pH do estômago e a ação antimicrobiana da pepsina são conhecidos por proporcionar um efeito barreira contra a entrada de bactérias no trato gastrointestinal (TGI). Neste contexto, uma das formas mais utilizadas para proteger essas bactérias durante a passagem pelo TGI é a encapsulação.

A técnica de encapsulação é, de modo geral, definida como o processo de revestimento de partículas muito pequenas possibilitando a utilização destas em ampla variedade de formas e produtos (LORENZ, 2009). Vários materiais encapsulantes e metodologias têm sido utilizados com sucesso no processo de microencapsulação. Dentre estes, o alginato de sódio se destaca pela sua facilidade de manuseio, sua natureza não-tóxica e seu baixo custo (SULTANA et al., 2000).

Lipossomas ou vesículas fosfolipídicas são vesículas esféricas, constituídas de uma ou várias bicamadas concêntricas de fosfolipídios que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo (FRÉZARD et al., 2005). Os lipossomas são estruturas úteis para o transporte de várias substâncias, especialmente drogas. Podem também carrear microrganismos, embora sua aplicação no uso de encapsulação de probióticos ainda seja restrita.

O presente trabalho foi desenvolvido visando à produção de *B. lactis* por fermentação, avaliação da encapsulação das células em alginato de cálcio e lipossomas e realização de testes *in vitro* das células livres e encapsuladas em fluidos simulados do trato gastrointestinal.

MARCO TEÓRICO

Probióticos

Hoje em dia, os alimentos não são mais vistos apenas como uma forma de saciar a fome, mas sim como a base para a prevenção de doenças causadas por uma dieta deficiente de nutrientes essenciais. Neste contexto, a busca por parte dos consumidores dos efeitos benéficos para a saúde proporcionados pelos alimentos vai além dos nutrientes que eles trazem, entrando em cena os chamados alimentos funcionais. Dentre estes, destacam-se os alimentos probióticos.

O termo “probiótico”, de origem grega, significa “para a vida”. FULLER (1989) definiu probióticos como sendo “suplementos alimentares à base de microrganismos vivos, que afetam benéficamente o hospedeiro, promovendo o equilíbrio de sua microbiota intestinal”. Diversas outras definições de probióticos foram publicadas nos últimos anos. Entretanto, a definição atualmente aceita internacionalmente é que eles são microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (SANDER, 2003).

Segundo a ANVISA (BRASIL, 2008), os alimentos com alegação de propriedade funcional e/ou de saúde no Brasil são licopeno, ácidos graxos ômega 3, luteína, fibras alimentares, zeaxantina, beta glucana, dextrina resistente, frutooligosacarídeo, goma guar parcialmente hidrolisada, inulina, lactulose, polidextrose, psillium, quitosana, fitoesteróis, manitol, xilitol, sorbitol, proteína de soja e os probióticos. A quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia.

Os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas são: controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrintestinal à colonização por patógenos; diminuição da população de patógenos através da produção de ácidos acético e lático, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes a este açúcar; estimulação do sistema imune; alívio da constipação; aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas. Embora ainda não comprovados, outros efeitos atribuídos a essas culturas são a diminuição do risco de câncer de cólon e de doença cardiovascular (SAAD, 2006).

A importância dos probióticos na saúde do indivíduo, desde o período neonatal até a vida adulta, tem sido muito discutida na literatura. Eles favorecem a presença de bactérias benéficas ao organismo e diminuem a concentração de microorganismos indesejáveis, apresentando também funções nutricionais e imunomoduladoras (MORAES e COLLA, 2006). A importância de manter uma microbiota intestinal saudável implica-se no fato de evitar uma série de doenças como síndrome do intestino irritável (que causa a prisão de ventre), diarreia, infecções e inflamações no trato gastrointestinal.

Muitos probióticos são estáveis somente por períodos limitados, ou seja, o tempo entre a fabricação e a ingestão deve ser muito curto, e devem ser armazenados em geladeira. Os principais veículos são os produtos lácteos como os iogurtes, leites fermentados e fórmulas lácteas infantis. Existem também os que são comercializados em cápsulas ou em pós, sendo esses mais estáveis, podendo ser armazenados em prateleiras e diluídos em líquidos. Quando os probióticos são expostos ao calor ou oxigênio pode ocorrer destruição das bactérias (VARAVALLO *et al.*, 2008).

***Bifidobacterium* sp. como agente probiótico em alimentos**

Bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* são algumas das mais freqüentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos, uma vez que elas têm sido isoladas de todas as porções do trato gastrintestinal do humano saudável. O cólon parece ser o local de preferência para colonização

intestinal das bifidobactérias (CHARTERIS *et al.*, 1998; BIELECKA *et al.*, 2002 *apud* SAAD, 2006).

Estes microrganismos, além de não apresentarem nenhuma patogenicidade, caracterizam-se pelo fato de serem algumas das primeiras bactérias a colonizarem o intestino do ser humano após o nascimento, e por isso são encontradas em maior número nos recém nascidos (CHEN e WALKER, 2005).

As bifidobactérias foram isoladas e descritas pela primeira vez por Tissier, em 1899, sendo denominadas de *Bacillus bifidus communis*. O gênero *Bifidobacterium* sp. foi proposto originalmente por Orla-Jensen, em 1924, mas somente em 1986 foi aceito e reconhecido como um gênero independente, na oitava edição do Manual Bergey's (TESHIMA, 2001 *apud* MAZO, 2009). Em geral, caracterizam-se por serem microrganismos gram-positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, catalase-negativos e anaeróbios, podendo apresentar formas variadas que incluem bacilos curtos e curvados a bacilos bifurcados (GOMES e MALCATA, 1999). A Figura 1 ilustra o aspecto morfológico de *B. lactis*.

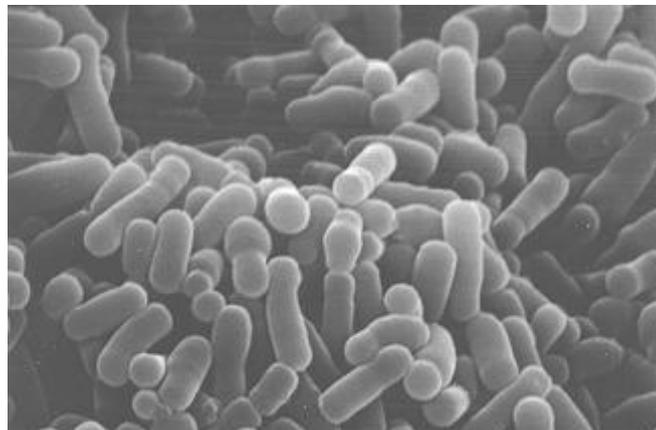


Figura 1 - Aspecto morfológico de *B. lactis* (Fonte: http://www.beactiviahealth.com/html_cap/activia.html)

A temperatura ótima de crescimento das bactérias bífidas abrange de 37°C a 41°C, não havendo crescimento em temperaturas abaixo de 25-28°C e acima de 43°-45°C. O pH ótimo de crescimento compreende a faixa de 6,0 a 7,0, não ocorrendo crescimento abaixo de 4,5 a 5,0 ou acima de 8,0 a 8,5 (SCARDOVI, 1986).

As bifidobactérias são 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 (SHIMAMURA *et al.*, 1992). As bifidobactérias mais estudadas e utilizadas como probióticos são das espécies *B. bifidum*, *B. breve*, *B. lactis* e *B. longum*.

Entre as espécies de bifidobactérias, é relatado que as estirpes de *B. animalis* subespécie *lactis* apresentam elevada tolerância ao oxigênio, o que lhes permite atingir um elevado número de produtos comerciais em condições não-anaeróbias. Devido a isso, as cepas de *B. lactis* são freqüentemente aplicadas em produtos lácteos probióticos, suplementos alimentares e em preparações farmacêuticas (PRASAD *et al.*, 1998).

Muitos trabalhos indicam que a sobrevivência destas bactérias probióticas no trato gastrointestinal humano é questionável, pois são sensíveis à elevada acidez. A obtenção de probióticos com células que resistam à passagem por essa barreira é, portanto, uma abordagem de grande interesse do ponto de vista nutricional e tecnológico (KAILASAPATHY, 2002), sendo necessária a busca por métodos que possam proteger a integridade da célula, sendo um deles a microencapsulação (LISERRE, 2005).

Microencapsulação de microrganismos probióticos

No início dos anos 70, Todd definiu microencapsulação como a tecnologia de empacotamento com finas coberturas poliméricas aplicáveis em sólidos, gotículas de líquidos ou material gasoso, formando pequenas partículas denominadas microcápsulas, que podem liberar seu conteúdo sob velocidade e condições específicas (FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2008). De acordo com SHAHIDI e HAN (1993), as microcápsulas têm a capacidade de modificar e melhorar a aparência e as propriedades de uma substância. Esses autores compilaram os seguintes motivos para o uso da microencapsulação na indústria alimentícia: (i) reduzir a reatividade do material de núcleo com o ambiente; (ii) diminuir a velocidade de evaporação ou de transferência do material de núcleo para o meio; (iii) facilitar a manipulação do material encapsulado; (iv) promover liberação controlada; (v) mascarar sabor e odor desagradáveis; e (vi) promover a diluição homogênea do material encapsulado

em uma formulação alimentícia. Dentro destas necessidades, o conceito de liberação controlada tem sido cada vez mais solicitado (GOUIN, 2004).

A microencapsulação é uma alternativa eficiente para a proteção de microrganismos probióticos. As principais vantagens do processo incluem:

- melhor controle das propriedades e da qualidade do produto;
- possibilidade de utilizar produtos sensíveis ao calor;
- os produtos podem ser secos a pressão atmosférica e baixas temperaturas;
- possibilidade de produções em larga escala em operação contínua com equipamento simples;
- obtenção de partículas relativamente uniformes e esféricas;
- boa eficiência e baixo custo do processo;
- pode suprimir ou atenuar *flavors* indesejáveis;
- aumento da estabilidade em condições ambientais adversas como a presença de luz, oxigênio e pH extremos.

Existem várias técnicas que podem ser utilizadas para a microencapsulação, sendo que a seleção do método é dependente da aplicação que será dada à microcápsula, do tamanho desejado, do mecanismo de liberação e das propriedades físico-químicas, tanto do material ativo, quanto do agente encapsulante. Dentre os métodos utilizados podemos citar a atomização por *spray-drying*, emulsificação, revestimento e extrusão (BURGAIN et al., 2011). Outras técnicas também podem ser utilizadas, tais como a encapsulação por inclusão molecular, coacervação, co-cristalização e lipossomas. Estas técnicas são de uso limitado pelo seu alto custo ou pelo fato de que as células bacterianas possuem muitas vezes um tamanho maior do que o tamanho da partícula formada (CHAMPAGNE e KAILASAPATHY, 2008).

As microcápsulas de bactérias probióticas também podem ser designadas para a ruptura em áreas específicas do corpo, como por exemplo, o intestino. Desta forma, um revestimento capaz de resistir às condições ácidas pode ser usado, permitindo que os ingredientes ativos consigam passar pelo estômago (STEVENS, 2005 *apud* LORENZ, 2009). Novas técnicas de microencapsulação estão sendo desenvolvidas para preservar a sobrevivência dos microrganismos ao atravessar o estômago e duodeno, pois eles precisam resistir ao poder bactericida do suco gástrico e da bile, respectivamente.

Muitos materiais podem ser utilizados como cobertura para as microcápsulas, dentre eles: goma arábica, ágar, alginato e carragena; os carboidratos como amido, amidos modificados, dextrinas e sacarose; as celuloses como carboximetilcelulose, acetilcelulose, nitrocelulose; os lipídios como parafina, mono e diacilgliceróis, óleos e gorduras; os materiais inorgânicos como sulfato de cálcio e silicatos; e as proteínas do glúten, caseína, gelatina e albumina (JACKSON e LEE, 1991).

Para o encapsulamento de células bacterianas viáveis, os materiais utilizados como excipientes devem ser suaves e não-tóxicos. A técnica de microencapsulação ou imobilização pode conferir uma proteção às bifidobactérias sensíveis ao pH ácido e também aumentar sua sobrevivência durante a vida de prateleira do produto, assim como durante a sua passagem pelo trato gastrintestinal.

Dentre os métodos de encapsulação, o método por extrusão tem sido um dos mais utilizados. Consiste na imobilização das células pelo uso de hidrocolóides (alginato e carragena) como materiais encapsulantes. Esse método consiste na preparação de uma solução de hidrocolóide adicionada de microrganismos, com posterior extrusão da suspensão celular através de uma agulha de seringa. Desse modo, formam-se gotículas que caem livres em uma solução de endurecimento ou banho de fixação. O veículo mais utilizado para a técnica de imobilização é o polissacarídeo alginato de sódio, que forma um gel em contato com cálcio e outros cátions multivalentes. As partículas de alginato são estáveis sob condições de baixo pH (Krasaekoopt, Bhabdari, Deeth, 2003). De acordo com Krasaekoopt e colaboradores (2003), trata-se de um método simples e de baixo custo, que não causa dano à célula probiótica, produzindo partículas com elevadas concentrações de células viáveis.

As vantagens da utilização do alginato incluem: a não toxicidade, a viabilidade das bactérias não é afetada durante a vida útil dos encapsulados e a reversibilidade de imobilização é facilmente conseguida por seqüestro de íons cálcio, liberando assim as células presas (SHEU e MARSHALL, 1993; SHAH e RAVULA, 2000).

Lipossomas

Os lipossomas são partículas aproximadamente esféricas formadas por bicamadas lipídicas que se organizam espontaneamente em estruturas fechadas do tipo concha esférica, capazes de encapsular em seu interior substâncias de diversas naturezas. Podem ser preparados a partir de misturas lipídicas naturais extraídas e purificadas, ou a partir de lipídios sintéticos disponíveis comercialmente (SANTOS e CASTANHO, 2002).

A principal vantagem da utilização de lipossomas é a mimetização das membranas celulares em propriedades e funções. Além disso, essas estruturas possuem relativa facilidade de incorporação de bioativos em geral, independentemente da sua carga, massa molecular ou caráter hidrofílico-hidrofóbico. São sistemas biodegradáveis, não-tóxicos e se encontram relativamente bem caracterizados em termos de estrutura, estabilidade, toxicidade e formas de administração *in vivo*. A Figura 2 mostra a estrutura de um lipossoma contendo um ingrediente ativo.

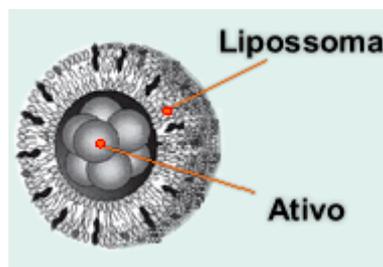


Figura 2 - Ilustração de uma vesícula lipossomal contendo um ingrediente ativo(Fonte: <http://www.srbrasil.com/lipossomas.html>)

Além de empregados como sistemas de liberação controlada de fármacos, os lipossomas encontram diversas outras aplicações, entre elas: uso em testes diagnósticos, processos industriais, cosmética e dermocosmética, transfusões sanguíneas, desintoxicação através da utilização de agentes quelantes, regeneração e hidratação do estrato córneo e epiderme, estabilização de fertilizantes e proteínas, indústria alimentícia, química e têxtil e em processos de catálise ou conversão de energia (CHANG, 1999; LASIC, 1998).

Para muitas das aplicações dos lipossomas, torna-se importante o entendimento de suas propriedades estruturais, especialmente em relação ao seu tamanho e número de bicamadas. Podem ser classificados em vesículas unilamelares gigantes ou GUV (“giant unilamellar vesicles”), com dimensões superiores a 1 μm , podendo chegar a dezenas de μm , em tamanho comparável ao de uma célula eucariota; vesículas unilamelares grandes ou LUV (“large unilamellar vesicles”), de diâmetro superior a 100 nm e vesículas unilamelares pequenas ou SUV (“small unilamellar vesicles”), com diâmetro entre 20 e 50 nm (SANTOS e CASTANHO, 2002).

JUSTIFICATIVA

A produção e encapsulação de *Bifidobacterium lactis* justificam-se pelas vantagens e benefícios à saúde que este microrganismo proporciona quando incorporado a alimentos, constituindo mais uma alternativa para a indústria alimentícia em relação à produção de alimentos funcionais contendo probióticos.

Uma preocupação pertinente em relação à aplicação de *B. lactis* como probiótico é o fato de que condições extremamente ácidas como as encontradas no estômago podem diminuir significativamente o número de células probióticas viáveis que chegam ao intestino.

Para tentar solucionar este problema, técnicas de microencapsulação podem ser utilizadas para melhorar a resistência das células ao passarem pelo trato gastrointestinal, chegando na quantidade adequada em seu local de ação e com a vantagem de liberar seu conteúdo sob condições específicas. A microencapsulação também permite proteger as células contra condições ambientais adversas, melhorando o tempo de prateleira do produto.

Diante da importância dos probióticos para a saúde, o presente trabalho visa à produção e encapsulação do *Bifidobacterium lactis* e a avaliação de sua tolerância a fluidos simulados do trato gastrointestinal, podendo assim exercer seus efeitos benéficos para a saúde.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Cultivar células de *Bifidobacterium lactis* e avaliar sua tolerância das células livres e encapsuladas a fluidos simulados do trato gastrointestinal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar *Bifidobacterium lactis* por fermentação em cultivos estacionário e agitado, a diferentes concentrações de inóculo, utilizando meio de cultivo padrão para bactérias lácticas (caldo MRS);
- Cultivar *B. lactis* utilizando como substrato soro de leite a partir das melhores condições de cultivo da etapa anterior;
- Realizar a caracterização físico-química do soro de leite;
- Realizar o acompanhamento cinético dos cultivos (absorbância, pH e células viáveis);
- Avaliar a eficiência da imobilização das células utilizando alginato como agente encapsulante;
- Avaliar a eficiência da imobilização das células em lipossomas;
- Realizar testes *in vitro* das células livres e encapsuladas com soluções de pH iguais ao do estômago e bile, visando simular as condições do trato gastrointestinal.

HIPÓTESES

- O cultivo de *B. lactis* por fermentação submersa em frascos agitados permite a obtenção de uma concentração celular adequada nos meios de cultura investigados.
- As células imobilizadas apresentam maior tolerância a fluidos simulados do trato gastrointestinal em relação às células livres.

METODOLOGIA

ÁREA

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Bromatologia e Microbiologia dos Alimentos da Universidade Federal de Pernambuco - Centro Acadêmico de Vitória, Vitória de Santo Antão - PE.

OBJETO DE ESTUDO E GRUPOS DE ESTUDO

O objeto de estudo foi avaliar a produção de *B. lactis* por fermentação e verificar a tolerância das células a fluidos simulados do trato gastrointestinal. Nesta etapa, foram elaborados ensaios com as células livres e imobilizadas visando avaliar a influência das condições de digestibilidade sobre a viabilidade das células.

PERÍODO DE REFERÊNCIA

Para estruturação e desenvolvimento do presente trabalho foi realizada uma revisão bibliográfica de trabalhos publicados até o ano de 2010 nas bases de dados Scielo, Periodicos Capes e Google Acadêmico, com o emprego das seguintes palavras-chave: *Bifidobacterium lactis*, encapsulação, alginato, lipossoma, ensaios de tolerância. A pesquisa foi realizada de maio de 2010 a junho de 2011.

DESENHO DO ESTUDO

Foi utilizado um desenho de estudo do tipo analítico experimental, que pode ser ilustrado na Figura 3.

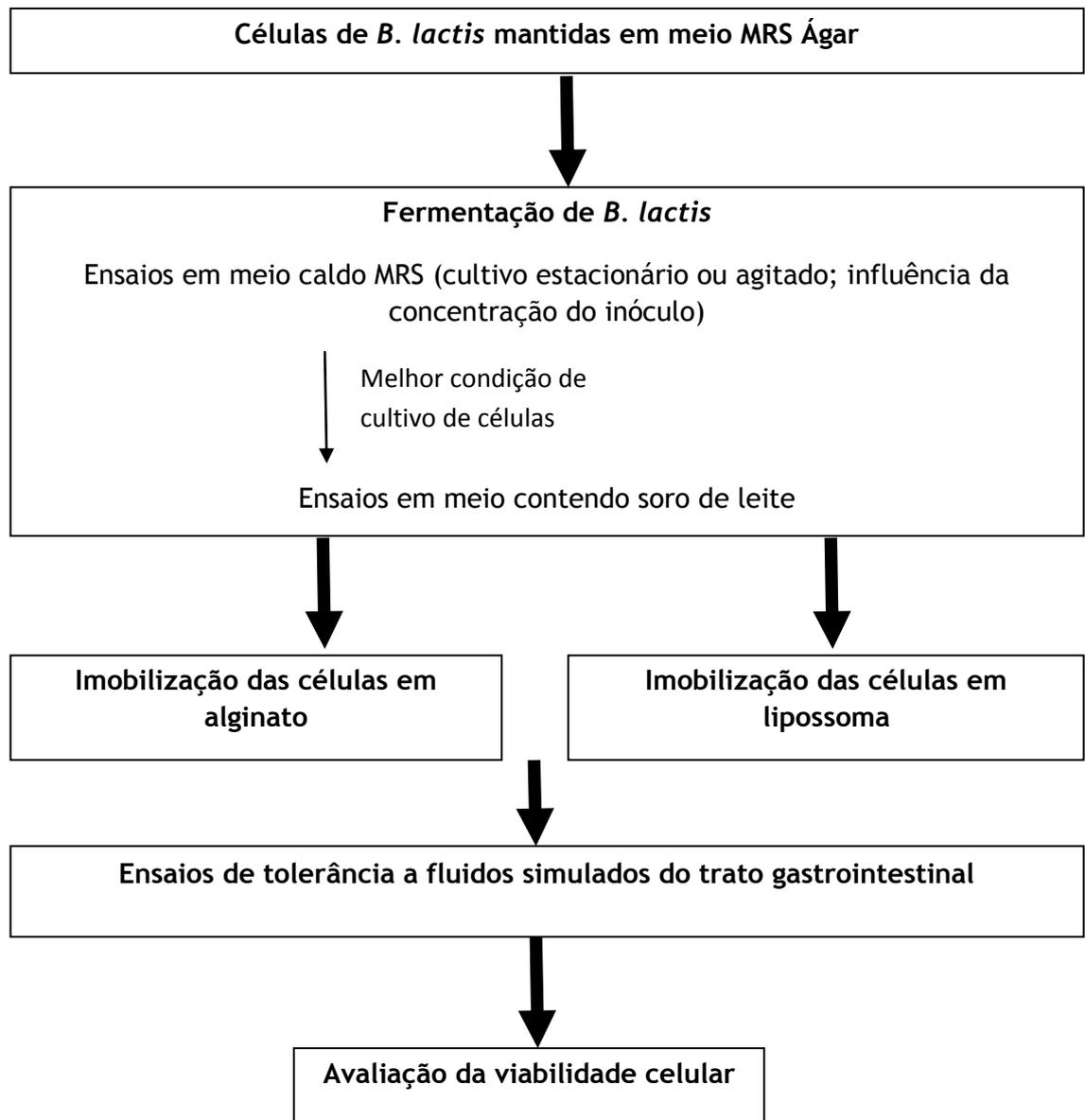


Figura 3 - Desenho de estudo empregado no trabalho

DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS

De acordo com cada etapa experimental, as variáveis estudadas no presente trabalho estão descritas abaixo:

Ensaio de fermentação

- a) Variáveis investigadas: concentração de inóculo, cultivo agitado ou estacionário, composição do meio de cultivo.
- b) Variável resposta: concentração de células viáveis.

Ensaio de imobilização das células utilizando alginato

- a) Variáveis investigadas: relação entre volume de suspensão alginato/células e massa de partículas secas; teor de umidade das partículas secas.
- b) Variável resposta: concentração de células viáveis.

Ensaio de imobilização das células utilizando lipossoma

- a) Variáveis investigadas: concentração de células viáveis.
- b) Variável resposta: eficiência de imobilização.

Ensaio de tolerância

- a) Variáveis investigadas: células livres ou células imobilizadas na presença de fluidos simulados do trato gastrointestinal.
- b) Variável resposta: concentração de células viáveis.

MÉTODO DE COLETA DE DADOS

A coleta de dados foi realizada a partir dos resultados experimentais obtidos nos ensaios laboratoriais, sendo os dados registrados em caderno de laboratório e em computador.

MÉTODOS DE ANÁLISE

Microrganismo e manutenção da cultura

A cultura liofilizada de *B. lactis* foi gentilmente cedida pela empresa Sacco Brasil®. O microrganismo foi ativado em tubos contendo meio caldo MRS durante

24 horas a 37°C, e em seguida inoculado em tubos inclinados contendo meio MRS Agar. A cultura era incubada por 72 horas a 37°C e mantida sob refrigeração a 5°C ± 1°C, sendo submetida a repiques periódicos.

Padronização do inóculo

Inicialmente, a cultura foi ativada em placa de Petri contendo meio MRS Agar por meio de inoculação em estrias, sendo cultivada por 72 horas a 37°C em condição microaerófila. Após este período, colônias isoladas foram transferidas para um tubo contendo 15 mL de solução salina 0,85% (p/v) até ser obtida uma suspensão turva, que foi padronizada pela escala de MacFarland (tubo número 0,5). Um volume de suspensão microbiana de 5 mL foi transferido para frasco Erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 45 mL meio caldo MRS, sendo o cultivo realizado a 37°C durante 5 horas, de forma estacionária. Este tempo foi estabelecido de forma a ser obtida a fase de crescimento exponencial.

Meios de cultura e condições de cultivo

Para avaliar a influência da concentração de inóculo e do tipo de cultivo sobre o crescimento celular, inicialmente o microrganismo foi cultivado em meio caldo MRS (Tabela 1), utilizando-se frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade. Foram investigadas as concentrações de inóculo de 1 e 5% (v/v) e o cultivo foi realizado de forma estacionária e sob agitação de 50 rpm.

Um segundo ensaio foi realizado em triplicata, utilizando-se meio formulado à base de soro de leite (40, 70 e 100% v/v). O soro foi gentilmente cedido pela empresa Natural da Vaca®, localizada em Gravatá-PE. Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL de capacidade contendo 200 mL de meio, concentração de inóculo de 5% (v/v), sob agitação de 50 rpm a 37°C, por um período de 48 horas. Amostras foram retiradas para análise de absorbância, pH e contagem de células viáveis. A composição do meio encontra-se descrita na Tabela 2.

Tabela 1 - Composição do meio caldo MRS

Composto	Concentração (g/L)
Peptona	10
Extrato de carne	10
Extrato de levedura	5
Dextrose	20
Polisorbato 80	1
Citrato de amônio	2
Acetato de sódio	5
Sulfato de magnésio	0,10
Sulfato de manganês	0,05
Fosfato dipotássico	2

Tabela 2 - Composição do meio à base de soro de leite

Composto	Concentração (g/L)
MnSO ₄ .H ₂ O	0,05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,10
Citrato de sódio	2,00
Acetato de sódio	5,00
K ₂ HPO ₄	2,00
Glicose	20,00
Tween 80	1,00
Extrato de levedura	25,00
Soro de leite	Volumes de 40, 70 ou 100mL*

* Valores para um volume total de 100mL

Caracterização físico-química do soro de leite

A caracterização físico-química do soro de leite utilizado na formulação do meio de cultura para a fermentação de *L. casei* foi realizada por meio da determinação de pH, umidade, proteínas e lipídios de acordo com os Métodos Analíticos Oficiais (Instituto Adolpho Lutz, 1985).

Métodos analíticos para os ensaios de fermentação

a) Contagem de células viáveis: foi avaliada por contagem de colônias crescidas em meio MRS Agar após diluições decimais utilizando solução 2% (p/v) de citrato de sódio. Os ensaios foram realizados em duplicata e o plaqueamento foi conduzido por meio da técnica *pour plate*. As amostras foram incubadas por 72 h a 37°C sob microaerofilia.

b) Determinação do pH: foram retiradas amostras de 3mL para leitura do pH por meio de potenciômetro (Marconi®).

c) Crescimento celular: foi avaliado de maneira indireta por meio de medidas de absorbância ao longo do tempo em espectrofotômetro (Marconi®), a 600nm.

d) Pesquisa de contaminantes:

- Análise microscópica a fresco e pela técnica de Gram;

- Meio MRS Ágar: empregado para verificar a pureza do caldo fermentado;

- Meio *Sabouraud* com Cloranfenicol: utilizado para pesquisar possíveis contaminações por fungos e leveduras. A presença do antibiótico de amplo-espectro cloranfenicol inibe a presença de bactérias, sendo adicionado assepticamente após a esterilização do meio a uma concentração de 100mg/L. As amostras foram inoculadas na forma de estrias sobre a superfície de placas de Petri contendo o meio, e incubadas a 30°C durante 48h.

- Meio CVB - Caldo Verde Brilhante: utilizado para realização do teste presuntivo para coliformes. Em um tubo de ensaio estéril contendo o meio de cultivo e um tubo de Durham, o material a ser testado foi inoculado com duas alçadas e incubado a 35°C ± 0,5°C por 24 a 48h. A presença de gás retido no tubo de Durham indicaria a presença de bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes totais;

- Meio EMB - Eosina Azul de Metileno: utilizado com o objetivo de verificar possíveis contaminações por bactérias Gram-negativas e diferenciar o aparecimento de colônias do tipo coliforme. Estas apresentam uma característica morfológica típica, com colônias com centro escuro e brilho metálico;

- Meio Específico para *Staphylococcus aureus*: utilizado para detectar eventual contaminação por este microrganismo. As placas foram incubadas a 35°C durante 48h;

- Meio caldo *Listeria*: em um tubo de ensaio estéril contendo o meio de cultivo, o material a ser testado foi inoculado com duas alçadas e incubado a 35°C ± 0,5°C por 24 a 48h. O aparecimento de turbidez no meio indicaria a presença do microrganismo.

Ensaio de imobilização das células em alginato

As células obtidas nos ensaios de fermentação em soro de leite foram centrifugadas sob refrigeração (Hermle®, modelo Z36HK), a 4000 rpm, 10°C por 1 min.

As microcápsulas foram preparadas a partir de uma solução de alginato de sódio (Danisco®) a uma concentração de 1% (p/v) em tampão fosfato 1M (pH 7) previamente esterilizado. Após a adição do alginato ao tampão estéril, a solubilização do biopolímero foi realizada em banho maria a 50°C, sob constante agitação.

A imobilização foi realizada pelo gotejamento de uma suspensão células/alginato a uma proporção volumétrica de 1:4 sobre um volume de 100mL de uma solução de CaCl₂ a 0,1M sob leve agitação, conforme ilustra a Figura 4. O gotejamento foi realizado empregando-se uma seringa contendo um volume de suspensão de 16,5mL.

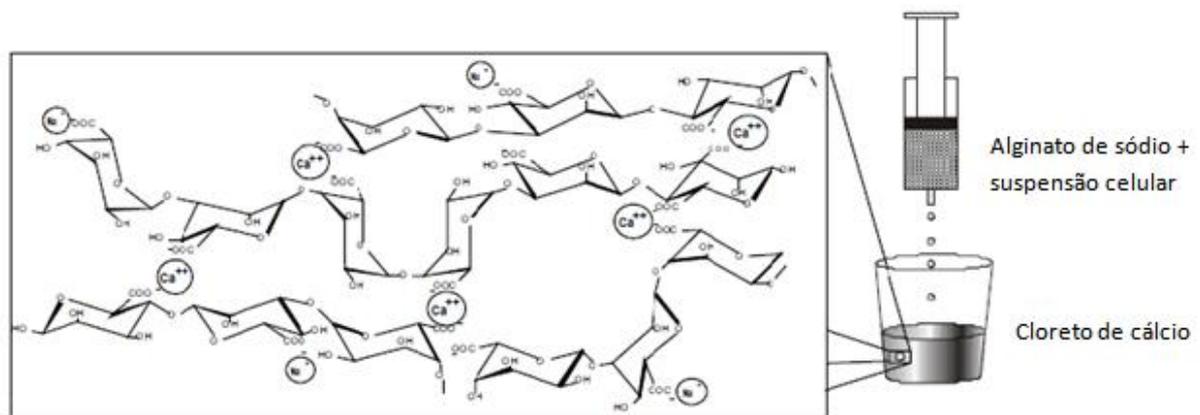


Figura 4 - Formação do gel de alginato de cálcio por engaiolamento

(FONTE: COVIZZI et al.,2007)

A Figura 5 ilustra o procedimento de imobilização por gotejamento e o aspecto visual das partículas formadas.

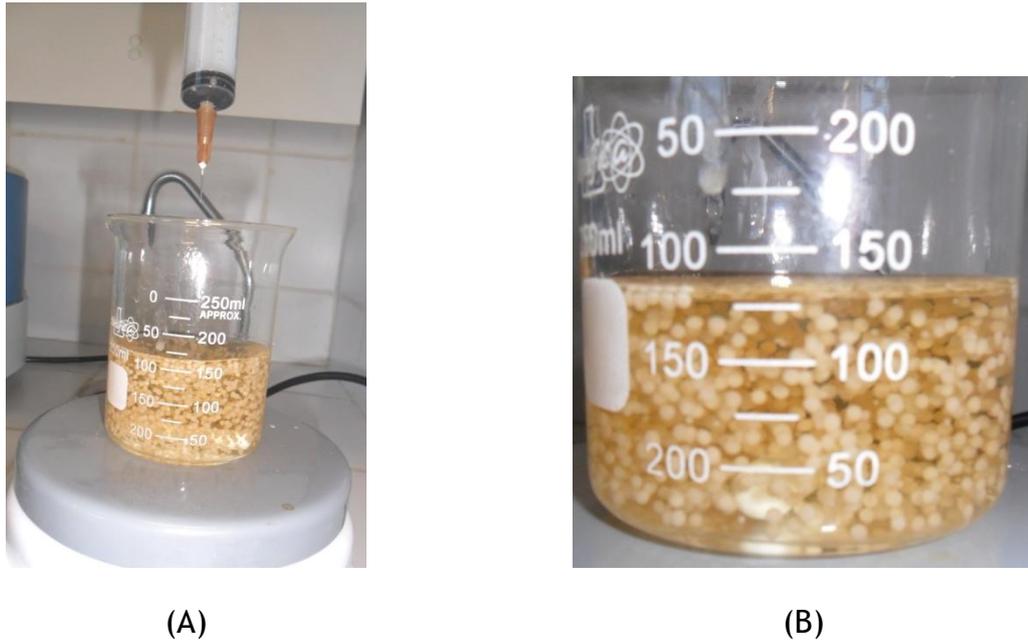


Figura 5 - Procedimento de imobilização por gotejamento (A) e aspecto visual das partículas formadas (B) durante a imobilização de *B. lactis* utilizando alginato como agente encapsulante

Após a imobilização das células, as partículas permaneciam em repouso por 2 horas a 10°C, sendo posteriormente lavadas duas vezes com solução salina (NaCl) a 0,85% (p/v). As partículas úmidas foram pesadas, sendo posteriormente submetidas a ensaios de secagem em triplicata a 35°C em estufa de circulação de ar até peso constante. As cápsulas secas foram pesadas e armazenadas sob refrigeração. A Figura 6 mostra o aspecto visual das partículas após secagem.

Amostras da suspensão de células centrifugadas, da suspensão células/alginato e das partículas secas foram retiradas para determinação da concentração de células viáveis.



Figura 6 - Aspecto visual das partículas secas contendo células imobilizadas de *B. lactis* pelo procedimento de imobilização com alginato

Ensaio de imobilização das células em lipossoma

A preparação do lipossoma foi realizada pelo método de Bangham (NEW, 1990) através da hidratação do filme seco de lipídios. Inicialmente, uma quantidade de 0,1 g de lipídio (lecitina de soja em pó, marca Viafarma®) foi solubilizada em 20 mL de uma solução de clorofórmio/metanol na proporção de 9:1 (v/v). A solução foi homogeneizada durante 5 minutos em evaporador rotatório (Marconi®), sendo, posteriormente, promovida a evaporação do solvente sob vácuo (650mmHg) com o balão imerso em banho maria a 33°C até a formação do filme seco de lipídios (tempo de 1,5 h), como pode ser observado na Figura 7.

As células foram encapsuladas no lipossoma através da hidratação do filme seco, adicionando-se um volume de 20 mL de uma suspensão concentrada de células ao balão contendo o filme seco. A suspensão foi submetida à agitação no rotaevaporador (sem vácuo e fora do banho-maria) durante 30 min. Posteriormente, a suspensão de lipossomas foi armazenada em tubo falcon de 50mL de capacidade, sob refrigeração a 10°C.



Figura 7 - Evaporador rotativo a vácuo utilizado no preparo de lipossomas contendo *B. lactis*

Para a contagem de células viáveis contidas nas partículas, uma amostra de 0,05 g foi transferida para uma solução contendo 1,25 mL de citrato de sódio 0,1M. A suspensão foi submetida a diluições seriadas e alíquotas de 10 μ L foram semeadas, em duplicata, pela técnica de *pour plate* em meio MRS Agar. As placas foram incubadas a 37°C por 72 h em jarra de anaerobiose (Figura 8).



Figura 8 - Jarras de anaerobiose usadas para incubação das placas.

Teste *in vitro* de tolerância gastrointestinal

A sobrevivência das células livres e encapsuladas de *B. lactis* foi avaliada em sucos gástrico e entérico simulados, utilizando-se pepsina, pancreatina e bile. Os experimentos foram realizados com base nos procedimentos de CHARTERIS et al. (1997), PICOT e LACROIX (2004) e LISERRE et al. (2007).

Foi preparada uma solução de pepsina (3 g/L) em solução salina estéril a 0,5% (p/v), sendo o pH ajustado para 2,0 com HCl a 5% (v/v). Soluções de pancreatina (2 g/L em solução salina estéril) e bile (3 g/L em água estéril) tiveram seu pH ajustado para 8,0. Todas as soluções foram filtradas assepticamente em membrana estéril de 0,2 µm.

Inicialmente, 2 mL de células centrifugadas foram lavados por duas vezes utilizando-se solução salina a 0,85% (p/v). Um volume de 1 mL desta suspensão celular foi adicionado à um Erlenmeyer de 125 mL de capacidade contendo 9 mL de solução de pepsina (3 g/L, pH 2,0), sendo a mistura incubada a 37°C em *shaker* por 120 min a 150 rpm. Após retirada de uma amostra (2 mL), foi adicionada a solução de pancreatina (concentração final de pancreatina na mistura de 2 g/L) e o pH foi alterado para 8,0. Após incubação nas mesmas condições e retirada de nova amostra após mais 120 min, foi adicionada a bile (concentração final de bile na mistura de 3 g/L) com manutenção do pH a 8,0. A mistura foi novamente incubada nas mesmas condições e, após um período de 120 min, uma amostra foi retirada. O experimento totalizou 6 horas de ensaio e foi realizado em duplicata. O mesmo procedimento foi realizado para os ensaios de tolerância utilizando a suspensão de lipossomas, utilizando-se um volume de 1 mL da suspensão lipossomal.

A Figura 9 mostra o aspecto visual das soluções utilizadas no ensaio.

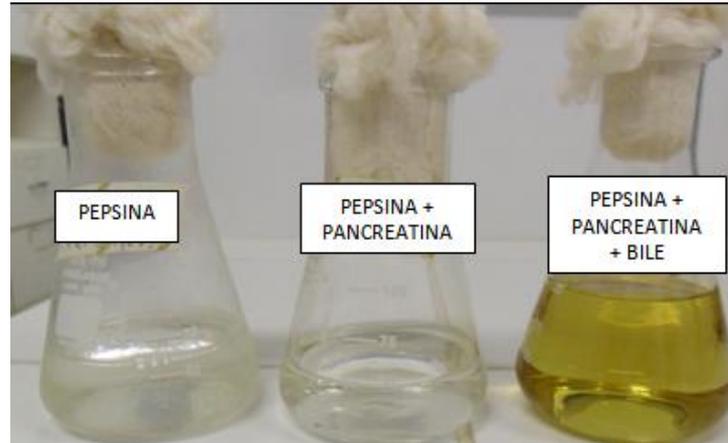


Figura 9 - Aspecto visual das soluções utilizadas no ensaio de tolerância

A contagem de células viáveis nas amostras foi realizada por meio de diluições seriadas em solução de citrato de sódio a 2% (p/v), inoculação em placas de Petri contendo meio MRS Agar pela técnica *pour plate* e incubação a 37°C por 72 h em jarra de anaerobiose.

ASPECTOS ÉTICOS

Não foi necessária a submissão do trabalho à aprovação pelo comitê de ética da Universidade Federal de Pernambuco pelo fato de que a pesquisa não foi realizada com seres humanos ou animais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 10 mostra os resultados para o cultivo do microrganismo em meio caldo MRS a diferentes concentrações de inóculo e na ausência ou presença de agitação (50 rpm) do sistema. O melhor resultado de crescimento celular foi observado na condição de 5% de inóculo a 50 rpm, enquanto que as demais condições de cultivo se mostraram semelhantes. Interessante observar que as curvas de crescimento não apresentam um perfil de crescimento exponencial, havendo uma tendência a um crescimento linear.

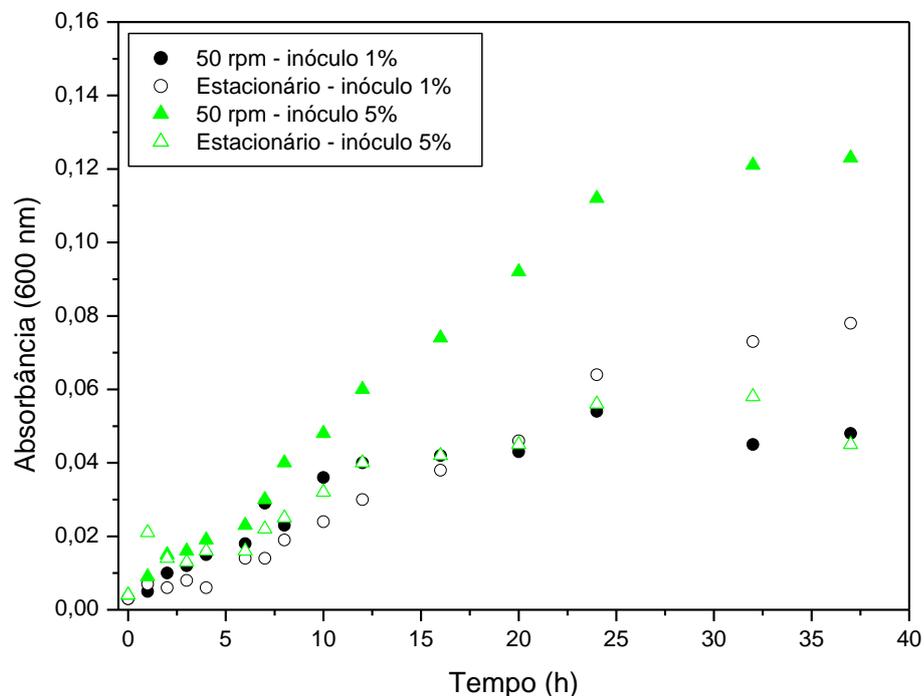


Figura 10 - Variação da absorbância durante o cultivo de *B. lactis* em meio caldo MRS nas condições de cultivo estacionário e agitado a 50 rpm e com concentrações de inóculo de 1 e 5% (v/v)

O oxigênio pode afetar as bifidobactérias pela sua toxicidade às células e pela produção de peróxido de hidrogênio. De acordo com SHIMAMURA *et al.* (1992), a tolerância ao oxigênio pelas bifidobactérias depende de cada espécie, sendo que neste trabalho a cultura de *B. lactis* se mostrou suficientemente aerotolerante nas condições de agitação empregadas. Gomes, Teixeira e Malcata (1998) citam que *B.*

lactis é considerada uma das mais promissoras bifidobactérias, pois possui boa tolerância ao oxigênio e a condições ácidas.

Com relação à variação de pH (Figura 11), nota-se uma variação pouco expressiva nos valores com tendência a uma diminuição do pH, salientando-se que este decréscimo é mais evidente na condição de 5% de inóculo a 50 rpm.

O ácido láctico é o principal produto do metabolismo das bactérias lácticas (cerca de 70 a 90% dos compostos gerados) e é sintetizado durante todo o processo de fermentação da lactose (FERREIRA, 2003). Dessa forma, essa pequena queda no pH durante o processo fermentativo pode ser explicada pela produção de ácidos pelo microrganismo.

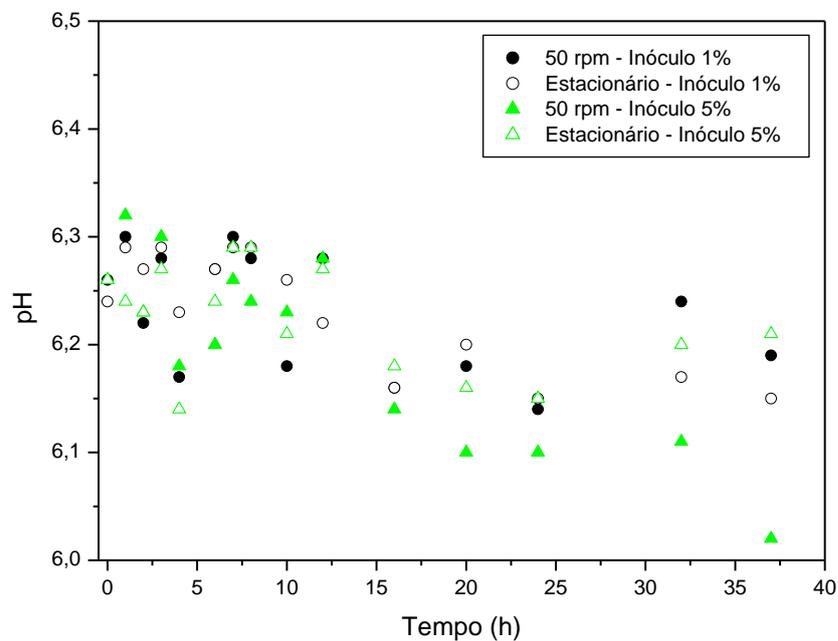


Figura 11 - Variação do pH durante o cultivo de *B. lactis* em meio caldo MRS nas condições de cultivo estacionário e agitado a 50 rpm e com concentrações de inóculo de 1 e 5% (v/v)

Com base nos resultados acima, foi selecionada a condição de 5% de inóculo a 50 rpm para o cultivo em meio formulado à base de soro de leite a diferentes concentrações. O soro apresentou os seguintes resultados em relação à sua composição centesimal (Tabela 3):

Tabela 3 - Composição centesimal do soro de leite empregado nos cultivos de *B. lactis*

Componente	Concentração média ¹ ± dp ² (%)
Proteínas	0,14 ± 0,00
Lipídios	0,10 ± 0,00
Umidade	95,23 ± 0,06
Cinzas	0,50 ± 0,10
Carboidratos	4,03 (por diferença)

1 - Média de três valores; 2 - Desvio padrão

Como mostra a Figura 12, apenas o meio contendo 100% de soro de leite na sua composição propiciou o crescimento celular, com fase linear de crescimento até as primeiras 10 h de cultivo e fase estacionária após este período. Para as demais condições empregadas, não foi observado aumento de absorbância, sugerindo uma carência de fonte de carbono no meio de cultura. Em se tratando da variação do pH, esta foi pouco expressiva para todas as condições ensaiadas, como ilustra a Figura 13. De acordo com Macedo et al. (2008), *B. lactis* possui grande capacidade de adaptação em pH reduzido.

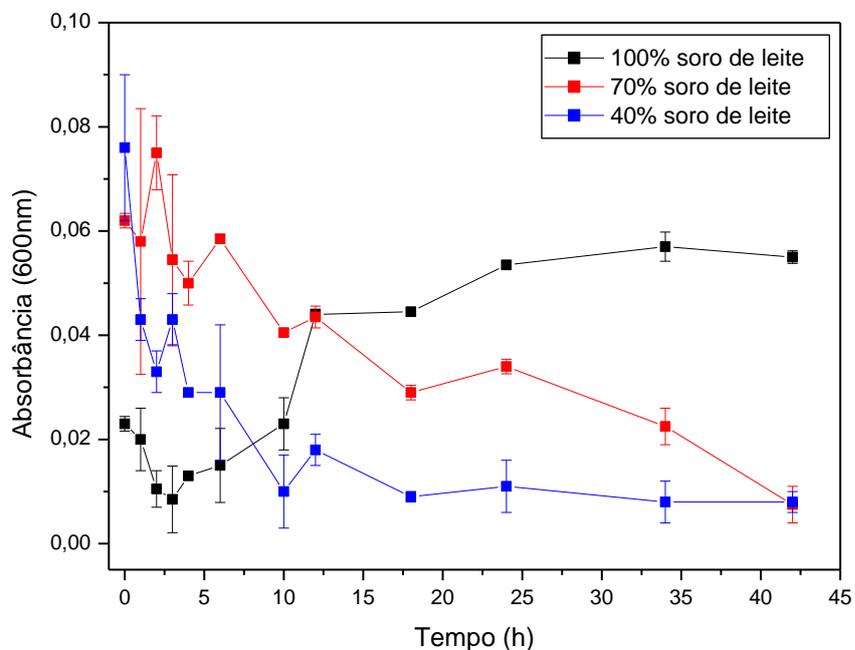


Figura 12 - Variação da absorbância durante o cultivo de *B. lactis* de acordo com o percentual de soro de leite no meio de cultivo

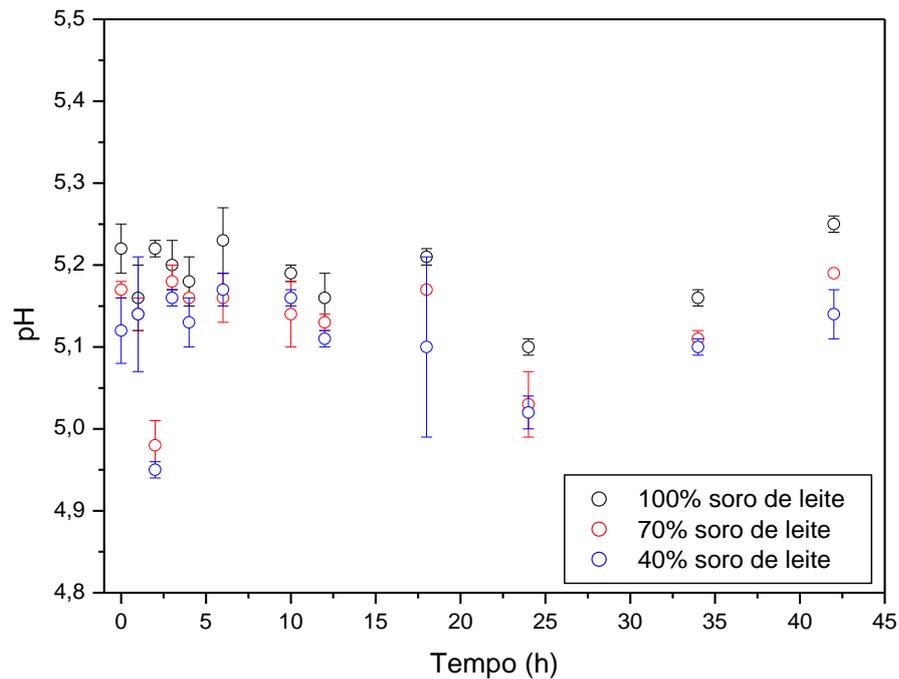


Figura 13 - Variação do pH durante o cultivo de *B. lactis* de acordo com o percentual de soro de leite no meio de cultivo

A Figura 14 mostra a concentração de células viáveis a partir de 15 horas de cultivo para o meio contendo soro de leite a uma concentração volumétrica de 100%. Os resultados mostram que a concentração máxima de células viáveis é atingida após 24 h, atingindo o valor de $3,9 \times 10^8$ UFC/mL. Após 45 h, ocorre uma diminuição do número de células viáveis no meio.

Svensson (1999) destacou os principais fatores a serem considerados durante a fabricação de alimentos probióticos, entre eles a composição do meio de fermentação e a quantidade de oxigênio dissolvido. Assim, a adição de hidrolisados protéicos de soro, extrato de levedura, glicose, vitaminas e minerais (sempre em proporções compatíveis com a legislação) pode estimular a multiplicação e a sobrevivência das culturas probióticas. A adição de proteínas resulta, também, no aumento da capacidade tamponante do meio e pode retardar a queda de pH, permitindo, assim, maior sobrevivência das cepas probióticas (Svensson, 1999; Lourens-Hattingh, Viljoen, 2001). Este fato pode explicar a pouca variação do pH durante o cultivo.

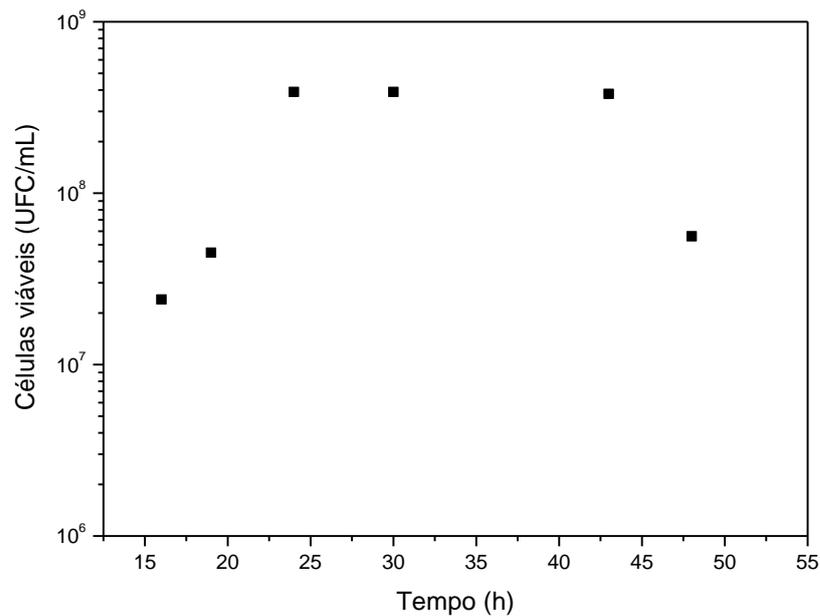


Figura 14 - Concentração de células viáveis durante o cultivo de *B. lactis* em meio à base de 100% de soro de leite

Os ensaios de imobilização com alginato evidenciaram que a partir de 16,5 mL de suspensão alginato/células foi obtida uma massa de 8 g de partículas úmidas. A secagem das partículas imobilizadas foi realizada por um período de 3 h, sendo observada uma umidade residual constante a partir de 90 minutos de secagem (Figura 16). A massa seca de partículas obtida após a secagem foi de 0,31 g.

Os resultados de concentração de células viáveis nas amostras de caldo fermentado, suspensão de células centrifugada, suspensão de células/alginato e nas partículas secas são mostrados na Tabela 4. Pode-se notar que ocorre uma acentuada diminuição da concentração de células viáveis nas partículas secas, provavelmente devido à perda de viabilidade das células durante o procedimento de secagem em estufa de circulação de ar. Estes resultados sugerem que a imobilização das células de *B. lactis* em alginato de sódio não seja eficaz devido à formação de uma matriz porosa do polímero, não conferindo uma barreira de proteção contra a ação do oxigênio sobre as células. Vale salientar que após um período de 20 dias ocorreu total da viabilidade das células. O aspecto visual da microcápsula de alginato de cálcio está mostrado na Figura 15.

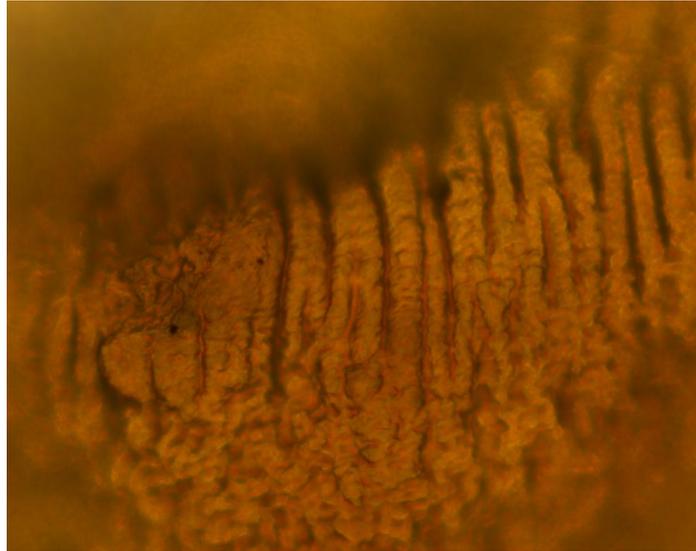


Figura 15 - Microcápsula de alginato de cálcio visualizada em microscópio óptico com aumento de 1000x

É importante ressaltar o fenômeno da limitação de transferência de massa imposta aos processos de imobilização celular em géis. Geralmente, a quantidade de O_2 que adentra às microesferas do gel de carragena é estimada na faixa de 0,08 a $0,1\text{mm}^3$, enquanto que em géis de alginato, estes valores são um pouco maiores (de 0,1 a $0,16\text{mm}^3$) (OGBONNA et al., 2000). Este seria um dos maiores problemas encontrados neste tipo de imobilização, pois o alginato não funcionaria como uma barreira eficaz contra a entrada de oxigênio, fato que se torna mais evidente em se tratando de microrganismos anaeróbios.

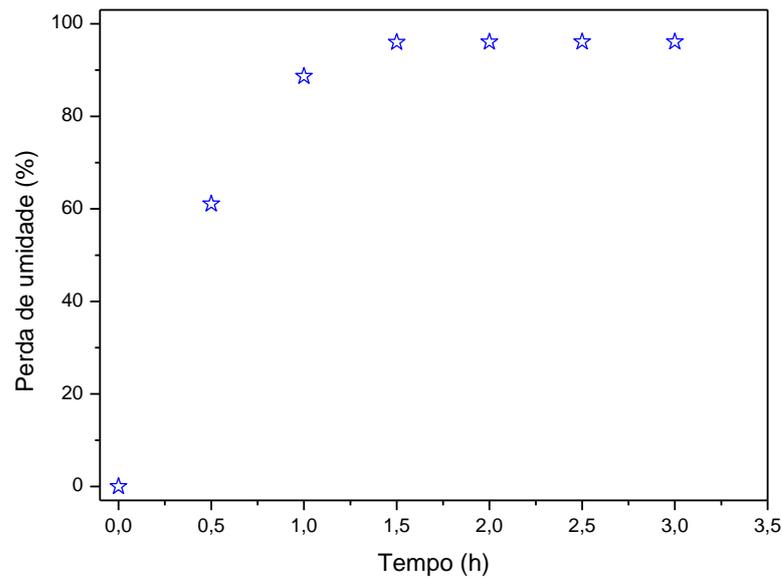


Figura 16 - Cinética de perda de umidade de partículas de alginato contendo células imobilizadas de *B. lactis* (massa inicial de partículas úmidas de 5 g)

Tabela 4 - Concentração de células viáveis de *B. lactis* de acordo com a amostra nos ensaios de imobilização com alginato

Amostra	Concentração de células viáveis
Caldo fermentado	$2,30 \times 10^9$ UFC/mL
Centrifugado	$6,35 \times 10^{10}$ UFC/mL
Suspensão células/alginato	$2,20 \times 10^8$ UFC/mL
Microcápsulas	$8,30 \times 10^5$ UFC/g

Grosso e Favaro-Trindade (2004) avaliaram a estabilidade de células livres e imobilizadas em alginato de uma cepa de *B. lactis* (Bb-12) em leite e em leite acidificado, bem como a estabilidade das células imobilizadas em iogurte durante um período de estocagem de 28 dias. Os autores verificaram um declínio da concentração de células viáveis de 10^8 UFC/mL para zero após o período de estudo. Por outro lado, os autores observaram uma boa viabilidade de *B. lactis* e de *L. acidophilus* em leite e em leite acidificado, tanto na forma livre como imobilizada em alginato de cálcio. Os autores concluíram que a imobilização de *B. lactis* em alginato de cálcio não funcionou como barreira efetiva contra a presença prejudicial das bactérias tradicionais do iogurte.

Os ensaios de encapsulação utilizando lipossomas demonstraram que após o processo de imobilização das células (Figura 17), a concentração de células viáveis na suspensão lipossomal foi de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Os ensaios de tolerância a fluidos simulados do trato gastrointestinal mostraram que, utilizando células livres, não foi observada a viabilidade das células em nenhuma das etapas do ensaio. Por outro lado, os testes com as células encapsuladas em lipossomas apresentaram resultados mais promissores (Figura 18).

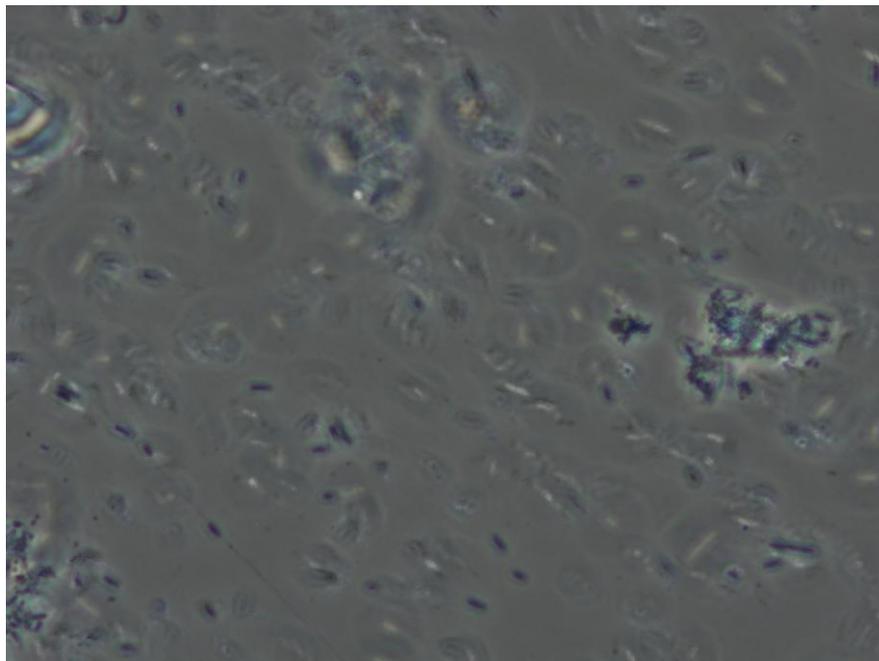


Figura 17 - Células de *B. Lactis* encapsuladas em lipossomas.

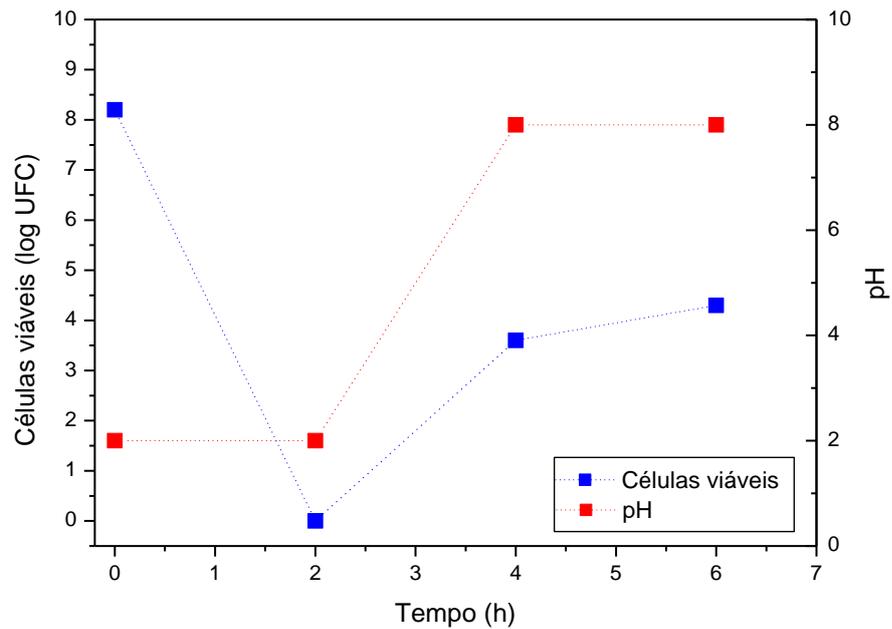


Figura 18 - Sobrevivência de células de *B. lactis* encapsuladas em lipossomas durante o ensaio de tolerância a fluidos simulados do trato gastrointestinal

Como pode ser observado, os testes de simulação em condições do trato gastrointestinal com as células encapsuladas sugerem que no primeiro estágio (presença de pepsina a pH 2,0) as células ficam em estado de latência após exposição por 2 h, não sendo detectada viabilidade celular. Após os estágios sucessivos na presença de pancreatina e bile (pH 8,0), ocorre uma pequena recuperação da viabilidade após um período total de ensaio de 6 h.

Estes resultados são similares aos obtidos por Estrota e colaboradores (2008), quando avaliaram a sobrevivência de *B. lactis* em leite integral e em extrato hidrossolúvel de soja em ensaios de simulação das condições gástricas e entéricas *in vitro*. Dessa forma, sugere-se a adição de ingredientes com função protetora para a incorporação de *B. lactis* em alimentos.

CONCLUSÕES

Como pode ser observado no presente trabalho, nos ensaios de fermentação conseguimos ver que a melhor condição para um bom crescimento de *B. lactis* foi com uma leve agitação de 50 rpm e a melhor concentração do inóculo foi a 5%.

O cultivo em meio contendo 100% de soro de leite se mostrou eficiente, com um número maior de células viáveis do que o mínimo exigido pela legislação, além do que é uma maneira mais econômica de produção dessas bactérias.

Quanto aos métodos de encapsulação, conclui-se que o método utilizando alginato de cálcio como agente encapsulante não foi eficaz para proteger as células de *B. lactis* contra os agentes agressores externos, principalmente contra a ação negativa do oxigênio. No entanto, a encapsulação em lipossoma mostrou-se mais eficiente.

Nos testes simulados do TGI com células livres, vimos que as mesmas não sobreviveram à passagem pelos sucos gástrico e entérico simulados. Com o microorganismo encapsulado em lipossomas, as células foram parcialmente protegidas da ação do pH e enzimas do trato gastrointestinal, sendo uma alternativa de encapsulação desse probiótico e constituindo-se numa formulação promissora para proteção das células.

REFERÊNCIAS

ACTIVIA. **Beactivia, Probiotics for digestive health.** Disponível em: <http://www.beactiviahealth.com/html_cap/activia.html> Acesso em: 10 de maio de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em julho/2008.** Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 02 Maio. 2011.

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.

CHAMPAGNE, C.P., KAILASAPATHY, K. **Encapsulation of probiotics.** In: Gardi, N. (Ed.), Delivery and Controlled Release of Bioactives in Foods and Nutraceuticals. Woodhead publishing Ltd., Cambridge, UK, pp. 344–369, 2008.

CHANG, T.M.S. “Future prospects for artificial blood”, **Trends Biotechnology**, v. 17, pp. 61-67, 1999.

CHARTERIS, W. P. et al. Development and application of in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology, Oxford**, v. 84, n. 5, p. 759-768, 1998.

CHEN CC, WALKER WA. **Probiotics and prebiotics: role in clinical disease states.** Adv Pediatr. 52:77-113, 2005.

COVIZZI, L.G., GIESE, E.C., GOMES, E., DEKKER, R.F.H., SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Seminário: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 28, n.2, p. 143-160, jul./dez. 2007.

DANONE WORLD NEWSLETTER. **Bifidobacteria.** Newsletter, n. 16, nov. 1997. Disponível em: <http://www.danonevitapole.com/nutri_views/newsletter/eng/news_16/sum.html>. Acesso em: 10 maio 2011.

E. A. ARAÚJO et al. Produção de queijo tipo Cottage simbiótico e estudo de sobrevivência das células probióticas. **Pesquisa Agropecuária Tropical** v. 39, n. 2, p. 111-118, abr./jun. 2009.

ESTROTRA, R. C. S. ; LIMA, R. A. B. ; BURITI, F. C. A. ; HARAMI, J. B. ; SAAD, S. M. I. . Sobrevivência in vitro de Bifidobacterium spp. , utilizando extrato hidrossolúvel de soja e leite como veículos alimentares. In: **Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo**, v. 16, Ribeirão Preto, 2008.

FAVARO-TRINDADE, C. S. et al. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Braz. J. Food Technol.**, v. 11, n. 2, p. 103-112, abr./jun. 2008.

FERREIRA, C. L. L. F. Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção. **Viçosa: Suprema Gráfica e Editora Ltda**, 2003. 205 p.

FRÉZARD, F. et al. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Quím. Nova**, Jun 2005, vol.28, no.3, p.511-518.

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

GOMES, A. M. P.; TEIXEIRA, M. G.; MALCATA, F. X. Viability of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in milk: sodium chloride concentration and storage temperature. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 22, n. 3, p. 221-240, 1998.

GOMES, A.M.P e MALCATA, F.X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Boletim de Biotecnologia**, Porto, nº 64, p. 12-22, dez. 1999.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science and Technology**, London, v. 15, n. 7-8, p. 330-347, 2004.

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. **Braz. J. Microbiol.** , v.35, p.151-156, 2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 2 ed., São Paulo, v. 1, p. 205,1985.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and Food Industry. **LWT - Food Science and Technology, London**, v. 24, n. 4, p. 289-297, 1991.

KAILA, Kailasapathy. Microencapsulation of Probiotic Bacteria:Technology and Potential Applications. **Curr. Issues Intest. Microbiol.**, 3: 39-48, 2002.

KRASAEOOPT, W., BHANDARI, B., and DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yogurt: a review. **International Dairy Journal** 13(1): 3-13, 2003.

LASIC, D.D., 1998, "Novel applications of liposomes", **Trends Biotechnology**, v. 16, pp. 307-321.

LISERRE, A. M. **Microencapsulação de *Bifidobacterium lactis* para aplicação em leites fermentados**. Tese de Doutorado apresentada a Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2005.

LORENZ, Juliana Goulart. **Comparação dos métodos de emulsificação e spray drying na microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) e aplicação em sorvete**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2009.

- LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrierfood. **Int. Dairy J.**, v.11, p. 1-17, 2001.
- MACEDO et al. Prebiotic effect of honey on growth and viability of Bifidobacterium spp. and Lactobacillus spp. in Milk. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 28(4): 935-942, out.-dez. 2008.
- MADUREIRA, A. R. et al. Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. **International Dairy Journal**, Alberta, v. 15, n. 6-9, p. 921-927, jun./set. 2005.
- MAZO, J. Z. Bifidobactérias: isolamento, identificação e aplicação em alimentos probióticos. **B.CEPPA**, Curitiba v. 27, n. 1, p. 119-134 jan./jun. 2009.
- MORAES F. P. e COLLA L. M. Alimentos funcionais e nutraceuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia** Vol 3 (2), 99-112, 2006.
- NEW, R.R.C. Liposomes: a practical approach. **Oxford: University Press**, p. 1-15, 33-103, 1990.
- OGBONNA, J. C.; MASHIMA, H.; TANAKA, H. Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. **Bioresource Technology**, Essex, v. 76, n. 1, p. 1-8, 2000.
- PICOT, A.; LACROIX, C. Effects of micronization on viability and thermotolerance of probiotic freeze-dried cultures. **International Dairy Journal**, v.13, p.455-462, 2003.
- PRASAD, J., Gonçalves, H., Smart, J. & Gopal, P. K. Seleção e caracterização de Lactobacillus e Bifidobacterium estirpes para uso como probióticos. **Int J Dairy** 8, 993-1002, 1998.
- RASIC, J. L.; KURMAN, J. A. Bifidobacteria and Their Role. Basel: **Birkhäuser Verlag**, 1983. 295p
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 42, n. 1, jan./mar., 2006.
- SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutr. Rev.**, New York, v.61, n.3, p.91-99, 2003.
- SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.A.R.B. "Lipossomas: a bala mágica acertou?", **Revista Química Nova**, v. 25, pp. 1181-1185, 2002.
- SCARDOVI, V. Genus Bifidobacterium. In: **BERGEY'S manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, p. 1418-1434, 1986.
- SHAH, N.P. and RAVULA, R.R. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. **The Aust. J. Dairy Technology**. 55: 139- 144, 2000.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

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

SHIMAMURA, S. et al. Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of Bifidobacterium species. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p.3296-3306, 1992.

STEFÉ, C. A. et al. Probiótico, prebiótico e simbiótico – artigo de revisão. **Saúde e Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v.3, n.1, p.16-33, jan-jun 2008.

SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate - starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 1-2, p. 47-55, 2000.

SVENSSON, U. Industrial perspectives. In: TANNOCK, G.W.(Ed) Probiotics: a critical review. **Wyndham: Horizon Scientific Press**, 1999, p.57-64.

VARAVALLO, M. A.; THOMÉ, J. N.; TESHIMA, E. Application of probiotic bacteria for prevention and treatment of gastrointestinal diseases. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 83-104, jan./jun. 2008.

ANEXO

Trabalho Aceito para apresentação na forma de pôster para o XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos. Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011.



Influência da densidade do inóculo em cultivo agitado e estacionário de *Bifidobacterium lactis*

Nízia Mayra de Oliveira, Christine Lamenha Luna Finkler

²Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória, Rua do Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista, 55608-680 Vitória de Santo Antão – PE - - E-mail: chrislluna@yahoo.com.br

RESUMO

Foi avaliada a influência da densidade do inóculo em cultivo agitado e estacionário de Bifidobacterium lactis em meio caldo MRS, e os resultados mostram que a melhor condição para crescimento celular foi a uma concentração de inóculo de 5% (v/v) a 50 rpm. Quando o microrganismo foi cultivado nestas condições em meio formulado à base de soro de leite, foi obtida uma concentração de células viáveis de $3,9 \times 10^8$ UFC/mL após 24 h de fermentação.

Palavras-chave: probiótico, soro de leite, fermentação