



Estabilidade de micro-organismos potencialmente probióticos em barra de cereais - efeito da técnica de incorporação

Gustavo Almeida Bastos¹; Elinalva Maciel Paulo²; Ana Cristina Nascimento Chiaradia^{1*}

¹Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas. Vitória, ES, Brasil.

²Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Laboratório de Microbiologia Aplicada e Saúde Pública, Feira de Santana, BA – Brasil.

RESUMO

Este trabalho objetivou desenvolver formulações de barras de cereais contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Saccharomyces boulardii* e avaliar a estabilidade destes micro-organismos potencialmente probióticos no produto elaborado durante o tempo de armazenamento (*shelflife*). Foram formuladas barras de cereais contendo separadamente os agentes probióticos *S. boulardii* e *L. acidophilus*, ambos nas formas liofilizada, granulados com lactose e encapsulados em alginato de cálcio. Foi avaliada a estabilidade dos micro-organismos durante o tempo de armazenamento. Tanto a levedura *S. boulardii* quanto a bactéria *L. acidophilus* apresentaram maior sobrevivência na forma liofilizada, quando comparado com as outras formas de incorporação, mantendo contagem na faixa de 7 log UFC/g, durante oito semanas e na faixa de 7 log UFC/g, durante seis semanas, respectivamente. Comparando os resultados da incorporação dos dois micro-organismos na forma livre liofilizada observou-se que a população de *S. boulardii* apresentou melhores resultados de viabilidade quando comparada com a população de *L. acidophilus*. Este estudo mostrou que é possível incorporar micro-organismos potencialmente probióticos em barras de cereais, preferencialmente na forma liofilizada, por proporcionar maior sobrevivência dos micro-organismos.

Palavras-chave: Barra de cereais. Probiótico. *Saccharomyces boulardii*. *Lactobacillus acidophilus*.

INTRODUÇÃO

A preocupação com a alimentação vem mudando nas últimas décadas, uma vez que há um aumento crescente do interesse dos consumidores por alimentos que assegurem não só o bem-estar e a saúde, mas que possam, também, reduzir o risco de doenças ao longo da vida (Roberfroid, 2002). Os alimentos funcionais possuem tais propriedades, com potencial para promover a saúde por meio de mecanismos não previstos na nutrição convencional (Roberfroid, 2007). A crescente demanda por este tipo de alimento pode advir do aumento nos custos de saúde, da crescente expectativa de vida e, também, do desejo das pessoas melhorarem a sua qualidade de vida (Siró et al., 2008).

O conhecimento da microbiota intestinal e suas interações levaram ao desenvolvimento de estratégias alimentares, objetivando a manutenção e o estímulo das bactérias normais ali presentes, surgindo com isso as formulações probióticas (Gibson & Fuller, 2000). A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando no aumento da resistência contra patógenos (Puupponen-pimia, 2002).

Diversas definições de probióticos já foram publicadas ao longo dos anos. Entretanto, a definição aceita internacionalmente é a de micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Food and Agriculture Organization of United Nations, 2001; Sanders, 2003). Diferentes linhagens microbianas são utilizadas como probióticos, devido às características funcionais que exercem no hospedeiro. Dentre estas se encontra o *Lactobacillus acidophilus* que faz parte da lista de alegações com propriedade funcional aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) referente a micro-organismos probióticos (Brasil, 2008). Apesar das leveduras não fazerem parte desta lista, diversos trabalhos relatam o efeito de algumas linhagens

de leveduras como um agente preventivo e terapêutico para o tratamento de uma variedade de doenças diarreicas, a exemplo a *Saccharomyces boulardii* (Pinto et al., 2007).

Swidsinski et al. (2010) verificaram que a microbiota e os sintomas clínicos da diarreia foram reversíveis com a terapia de *S. boulardii*. Por meio da análise da estrutura funcional da microbiota das fezes foi possível monitorar quantitativamente o mau funcionamento do cólon e a sua resposta à terapia. Foi constatado que a terapia com *S. boulardii* melhora significativamente a bioestrutura das fezes de pacientes com diarreia crônica idiopática e não tem qualquer influência sobre a microbiota de fezes em indivíduos saudáveis.

Tradicionalmente, probióticos são adicionados a iogurtes e outros produtos lácteos. Existe uma crescente procura por produtos não-lácteos com propriedades probióticas (Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010).

A ascensão do vegetarianismo e interesses dos consumidores em relação a uma dieta livre de colesterol e lactose é de grande interesse para os pesquisadores. Desta forma, os produtos alimentares, tais como sucos de frutas e vegetais, frutas minimamente processadas, legumes crus e fermentados, azeitonas, alcachofras e cereais, foram inoculados com micro-organismos probióticos e mostraram resultados promissores (Martins et al., 2013).

Salmerón et al. (2014) analisaram a cinética da fermentação e o flavour de nove bebidas de cereais fermentadas por *L. acidophilus*, *L. plantarum* e *L. reuteri*.

O desenvolvimento de embutido cárneo fermentado com *L. casei* e *L. paracasei* demonstrou a viabilidade destas células no produto final com a preservação das propriedades tecnológicas e sensoriais (Macedo et al., 2008).

As barras de cereais atualmente estão sendo bastante consumidas como lanches intermediários nos intervalos das refeições, por possuírem fibras, o que propicia maior saciedade. São elaboradas a partir da extrusão da massa de cereais com adição de pastas de frutas, sendo fonte de vitaminas, sais minerais, fibras, proteínas e carboidratos complexos, ingredientes estes, que melhoram o funcionamento do sistema digestório e o trânsito intestinal (Gutkoski et al., 2007).

Este trabalho objetivou desenvolver formulações de barras de cereais contendo *L. acidophilus* e *S. boulardii* e avaliar a estabilidade destes micro-organismos potencialmente probióticos no produto elaborado durante o tempo de armazenamento (*shelf life*).

MATERIAL E MÉTODOS

Ingredientes da barra de cereais

Os ingredientes utilizados foram adquiridos no comércio varejista de Vitória-ES. Foram eles: flocos

de arroz, aveia em flocos longos, nozes, castanha de caju, castanha do Brasil, amêndoa, banana passa, uva passa, açúcar mascavo e xarope de glicose de milho. A proporção de ingredientes secos e xarope de aglutinação foi de 65:35.

Processamento da barra de cereais

Na preparação do xarope de aglutinação, os ingredientes foram adicionados e aquecidos sob agitação. Foi acompanhado o teor de sólidos solúveis totais em refratômetro manual até obtenção de um xarope de 85-89° Brix.

Os ingredientes secos (cereais, frutas desidratadas, sementes), foram misturados com o micro-organismo potencialmente probiótico e misturados ao xarope de aglutinação a uma temperatura de 40°C. Em seguida procedeu-se a enformagem e laminação, em uma forma de aço inoxidável.

Após o resfriamento em geladeira por 10 minutos, as barras de cereais foram cortadas e desenhadas em tamanhos retangulares 10x3x1 cm, e peso de aproximadamente 25 gramas cada unidade. As barras foram acondicionadas individualmente em embalagens de filme flexível laminado.

Culturas Probióticas

Foram utilizados dois micro-organismos probióticos para a formulação da barra de cereais. *L. acidophilus* LA-14 FloraFIT, liofilizado (Danisco Brasil Ltda): sachê contendo $2,0 \times 10^{11}$ células/g, e *S. boulardii* liofilizado (Floratil®, Merck): sachê contendo $0,5 \times 10^9$ células/mg. Ambas as amostras apresentavam-se dentro do prazo de validade e foram obedecidas as recomendações do fabricante para armazenamento.

Formulação da barra de cereais

A diferença entre as formulações se deu pela cultura probiótica utilizada (*L. acidophilus* ou *S. boulardii*), pela quantidade de micro-organismos adicionados e pela forma de incorporação destes micro-organismos na barra de cereais, conforme mostra a Tabela 1. Todas as formulações desenvolvidas das barras de cereais ficaram acondicionadas em temperatura ambiente durante todo o processo do experimento.

Tabela 1 - Formulações para incorporação dos micro-organismos probióticos na barra de cereais

Micro-organismos e forma incorporada	Quantidade/concentração de cels. incorporada na barra de cereais (25g)
Concentrado de <i>S. boulardii</i> granulado com lactose	1g ($5,0 \times 10^8$ UFC)
Concentrado de <i>S. boulardii</i> encapsulado em alginato de cálcio	1g ($5,0 \times 10^8$ UFC)
Células livres de <i>S. boulardii</i> liofilizadas	100mg ($5,0 \times 10^7$ UFC)
Células liofilizadas de <i>L. acidophilus</i> encapsuladas em alginato de cálcio	1g ($2,0 \times 10^{11}$ UFC)
Células livres de <i>L. acidophilus</i> liofilizadas.	100mg ($2,0 \times 10^{10}$ UFC)

Incorporação do S. boulardii na barra de cereais

Granulação do concentrado celular de S. boulardii com lactose

Inicialmente preparou-se um concentrado celular a partir da cultura liofilizada da *S. boulardii*. A cultura foi ativada em 200 mL de caldo YPG (1% Extrato de levedura - HIMEDIA, 2% Peptona - HIMEDIA, 2% Glicose, 2% Agar - HIMEDIA). Foram adicionados 20 mg do Liofilizado FLORATIL®, MERCK, seguido de homogeneização. O frasco erlenmeyer foi incubado, em estufa de incubação tipo B.O.D THELGA TF 34P, a 28°C ± 1 sob agitação de 150 rpm, por 48 horas. O material foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C (Centrífuga Eppendorf 5804R). O material foi lavado duas vezes com solução tampão fosfato pH 7,2. Foi realizada a contagem das células viáveis semeando no Agar YPD, incubando a 28°C ± 1 por 72h.

A granulação do concentrado de levedura na lactose procedeu-se na proporção de 1:4. A mistura do micro-organismo com a lactose se deu por compactação, até obtenção dos briquetes. Para a calibração dos grânulos foi utilizado um tamis malha 20 mesh. Todos os utensílios utilizados no procedimento estavam devidamente esterilizados.

Concentrado de *S. boulardii* microencapsulados em alginato de cálcio

As esferas foram produzidas pela técnica de extrusão, de acordo com o método descrito por Albertini et al. (2010), com algumas modificações. Foi preparada uma solução contendo alginato de sódio 1% (m/v) com água destilada. A solução obtida foi autoclavada a 121°C durante 15 minutos.

Foi adicionado o concentrado de levedura na solução de alginato de sódio 1% (m/v), na proporção de 1:4, sendo a mistura homogeneizada durante 30 minutos. Para o processo de extrusão foi utilizada uma seringa estéril BD SoloMed™ de 5 mL com agulha 25 mm e diâmetro interno 0,7 mm. A suspensão contendo micro-organismos probióticos, foi gotejada em solução estéril de cloreto de cálcio 0,1 M, sob agitação magnética. As esferas formadas foram deixadas em repouso por 45 minutos na solução de cloreto de cálcio, posteriormente filtradas a vácuo e lavadas por três vezes com 400 mL de água destilada esterilizada.

Células livres liofilizadas de S. boulardii

Foram incorporados 100mg do liofilizado da *S. boulardii* proveniente do medicamento comercial Floratil®, Merck, diretamente na mistura dos cereais durante o preparo da barra de cereais.

Incorporação dos L. acidophilus na barra de cereais

Liofilizado de *L. acidophilus* LA-14 FloraFIT (Danisco) encapsulados em alginato de cálcio

Foi suspenso 1g da cultura probiótica liofilizada de *L. acidophilus* - LA - 14 na solução de alginato de sódio 1% (m/v) na proporção de 5% (m/m), sendo a mistura homogeneizada durante 30 minutos. O processo de extrusão

foi o mesmo descrito para a *S. boulardii*. As esferas foram produzidas conforme descrito na encapsulação da *S. boulardii*.

Células livres liofilizadas de *L. acidophilus* LA-14 FloraFIT (Danisco) em barra de cereais

Foram incorporados 100mg do liofilizado de *L. acidophilus* LA-14 diretamente na mistura dos cereais durante o preparo da barra de cereais.

Acompanhamento da viabilidade dos micro-organismos adicionados na barra de cereais durante o período de armazenamento

As contagens de células destes micro-organismos foram realizadas por um período de 8 semanas (*S. boulardii*) e 7 semanas (*L. acidophilus* LA-14). Para padronização do processo, o tempo zero correspondeu à análise 24 horas após a data de fabricação da barra de cereais.

Viabilidade da S. boulardii na forma granulada com lactose

Para a realização da contagem dos micro-organismos em todas as formulações, foram preparadas diluições seriadas; 25g da amostra foi misturada em 225 mL da solução salina tampão fosfato pH 7,2, originando a diluição inicial (10-1). A partir desta diluição foram preparadas demais diluições decimais até 10-7. A semeadura foi realizada pelo método do “pour plate”, utilizando como meio de cultura o Agar YPD. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica, a 37 ± 1°C por 72 horas. Placas contendo 25 a 250 colônias foram contadas e o resultado expresso como o logaritmo das unidades formadoras de colônias (UFC) / g de amostra (Silva ET AL., 2010).

Viabilidade da S. boulardii na forma encapsulada em alginato de cálcio

Inicialmente, uma porção da amostra diluída (10-1) ficou sob agitação por 2 horas em agitador magnético (marca Lederer e Avancini, modelo LAHD-300) para que as células fossem liberadas das microcápsulas. Após a agitação da amostra, demais diluições decimais foram preparadas e procedeu-se a determinação da viabilidade celular seguindo o mesmo procedimento da formulação da forma granulada com lactose.

Viabilidade das células livres liofilizadas de S. boulardii

Procedimento realizado conforme a determinação da viabilidade celular da *S. boulardii* na forma granulada com lactose.

Viabilidade de células liofilizadas de L. acidophilus LA-14 encapsuladas em alginato de cálcio

A determinação da viabilidade celular dos lactobacilos nesta formulação, procedeu-se da mesma forma para a determinação da viabilidade da *S. boulardii* na forma encapsulada em alginato de cálcio, exceto que o meio utilizado foi o Agar DeMan, Rogosaand Sharpe (MRS) (De Man et al., 1960).

Viabilidade de células livres liofilizadas de *L. acidophilus* LA-14

Realizado conforme a contagem das células liofilizadas de *L. acidophilus* LA-14 encapsuladas em alginato de cálcio, exceto que a diluição inicial (10-1) não ficou sob agitação.

Todas as análises realizadas neste trabalho foram realizadas em triplicatas.

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5%, utilizando-se o programa GraphPadPrism 5.00. Foi utilizado o teste de Tukey para comparação das médias.

RESULTADOS

A produção do concentrado da cultura liofilizada da *S. boulardii* Floratil®, Merck gerou em média 3,82g (2,3 x 10⁹ UFC/g). Quanto à cultura liofilizada de *L. acidophilus* LA-14 FloraFIT (Danisco) não foi possível gerar concentrado em quantidades significativas, razão pelo qual não foi realizada formulação com concentrado desta bactéria.

As Tabela 2 e 3 apresentam os resultados do acompanhamento da viabilidade dos micro-organismos incorporados na barra de cereais para cada tipo de formulação.

A Figura 1 compara os resultados da incorporação dos dois micro-organismos na forma livre liofilizada.

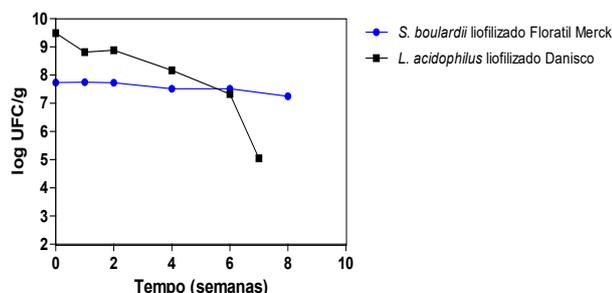


Figura 1. Curva de sobrevivência da população de *S. boulardii* liofilizado Floratil®, Merck e *L. acidophilus* LA-14 Flora FIT, liofilizado Danisco.

DISCUSSÃO

Verifica-se por meio da análise da Tabela 2 que a formulação em que a levedura *S. boulardii* foi incorporada na barra de cereais na forma liofilizada apresentou melhores resultados quando comparado com as formulações com micro-organismos encapsulados ou granulados com lactose. Ao final de 8 semanas de armazenamento, apresentava contagem de 7,24 log UFC/g com redução de 0,49 log UFC/g em relação ao tempo 0 (zero), correspondendo a um decréscimo de 6,39%.

Tabela 2 - População viável de *S. boulardii* (Média ± DP, n=2) durante o armazenamento, nas diferentes formulações de barra de cereais,

Tempo (Semanas)	<i>S. boulardii</i> (log UFC/g)		
	Granulado com lactose	Encapsulado em alginato de cálcio	Células Livres Liofilizadas
0	6,69±0,23 ^a	8,09±0,10 ^a	7,73±0,01 ^a
2	6,18±0,08 ^{ab}	7,70±0,11 ^{ab}	7,72±0,06 ^a
4	5,81±0,32 ^{ab}	6,80±0,49 ^b	7,51±0,05 ^b
6	5,50±0,43 ^b	5,57±0,60 ^c	7,53±0,05 ^b
8	5,32±0,61 ^b	4,56±0,44 ^c	7,24±0,01 ^c

a,b,c – médias com pelo menos uma letra igual na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância (p>0,05).

Tabela 3 - População viável de *L. acidophilus* durante o armazenamento (Média ± DP, n=2) nas duas formulações de incorporação na barra de cereais.

Tempo (Semanas)	<i>L. acidophilus</i> (log UFC/g)	
	Encapsulados em alginato de cálcio	Células Livres Liofilizadas
0	7,72 ^a	9,50±0,41 ^a
2	<5 ^b	8,89±0,08 ^{ab}
4	-	8,17±0,04 ^{bc}
6	-	7,33±0,13 ^c
7	-	5,05±0,56 ^d

a,b,c,d – valores com pelo menos uma letra igual na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância (p>0,05).

A formulação com *S. boulardii* submetida à granulação com lactose apresentou, no tempo zero, contagem de 6,69 log UFC/g, apresentando, no final de 8 semanas, um decréscimo de 1,37 ciclos logarítmicos (20,48%).

A formulação em que a *S. boulardii* foi incorporada na barra de cereais na forma encapsulada em alginato de cálcio, apresentou no tempo 0 uma contagem de 8,09 log UFC/g, sofrendo um decréscimo de 3,53 ciclos logarítmicos (56,37%) em 8 semanas de armazenamento.

No processo da encapsulação com alginato de cálcio, as limitações de transferência de massa podem afetar a fisiologia e cinética do crescimento celular (Covizzi et al., 2007). Aliado a isso, também tem o estresse térmico sofrido pelo micro-organismo durante o processo de secagem das cápsulas (Gutkoski et al., 2007).

Pardo et al. (2009) mostraram em trabalhos realizados com esta espécie de levedura que a viabilidade e vitalidade da levedura *S. boulardii* são parâmetros independentes. Qualquer problema ou situação que representa uma tensão para a levedura (congelamento, aquecimento, hiperosmolaridade, falta de nutrientes, presença de metabólitos tóxicos, etc.) parece afetar a vitalidade desta, sem necessariamente provocar uma diminuição na viabilidade celular.

Não foram encontrados, na literatura, trabalhos com a levedura *S. boulardii* incorporadas em matriz alimentar.

Entretanto, tem sido extensamente utilizada, na forma liofilizada em medicamento, para tratar pacientes com reincidência de diarreia associada à *Clostridium difficile* e reposição de microbiota intestinal (Surawicz et al., 2000; Saint-Marc et al., 1995).

S. boulardii é uma levedura não patogênica e exerce seu efeito terapêutico durante sua permanência em trânsito na luz intestinal, já que não coloniza a mucosa intestinal de maneira permanente (Saint-Marc et al., 1995; Migowski & Pugliese, 2009). Desta forma a administração deve ser realizada de maneira repetida, regular e em concentração que tenha efeito probiótico (Fuller, 1992).

Vários produtos comercializados já possuem células de *L. acidophilus*, seja na forma livre ou na forma encapsulada, a exemplo de queijos, mousses, sorvetes, manteigas, etc., sendo estes produtos armazenados em baixas temperaturas. Manter esta espécie bacteriana incorporada em matrizes alimentares, permanecendo a população com alta sobrevivência em temperatura ambiente, constitui um desafio. No presente experimento, quando os *L. acidophilus* LA-14 liofilizados encapsulados em alginato de cálcio foram incorporados na barra de cereais, observou-se grande decréscimo na população viável a partir da segunda semana de armazenamento em temperatura ambiente, ficando abaixo de 5,0 log UFC/g (tabela 3). Porém, a barra de cereais contendo as células liofilizadas na forma livre apresentou população viável de 8,89 log UFC/g, no mesmo período de armazenamento, contradizendo alguns trabalhos em que células probióticas incorporadas na forma encapsuladas permanecem mais estáveis quando comparadas com as células livres.

De acordo com Macedo et al. (2008), o decréscimo na contagem bacteriana pode estar relacionado a vários fatores como acidificação do produto, nível de oxigênio no produto, permeação do oxigênio através da embalagem e presença de compostos antimicrobianos. Aklain e Erisir (2008), em trabalho no qual incorporaram *L. acidophilus* livres em sorvete, armazenado por 90 dias a -18°C mostraram que houve um declínio de 0,3 log UFC/g durante o armazenamento, atingindo 5,0 log UFC/g. Resultados semelhantes foram encontrados por Barreto et al. (2003), que avaliaram a viabilidade de *L. acidophilus*, em 177 amostras de 15 marcas de produtos probióticos comercializados no Brasil. Em 52% dos produtos contendo o *L. acidophilus*, as contagens estavam abaixo de 5,0 log UFC/g.

Em estudo com mousses de chocolate Borges et al. (2004), observaram um decréscimo de 3 log UFC/g da população *L. acidophilus* livres, após o vigésimo dia de armazenamento. Com o emprego da mesma proporção de *L. acidophilus* microencapsulados no produto, os autores observaram um decréscimo de 2 log na população do probiótico.

Ribeiro et al. (2009), verificaram que não houve uma redução significativa na população de *L. acidophilus* encapsulado em alginato de cálcio, em queijo Minas frescal, sob refrigeração a 5°C durante 28 dias.

Porém alguns autores observaram que a encapsulação em alginato de cálcio somente foi eficaz para a proteção das culturas de *Lactobacillus paracasei* L26, *L. casei* 01, *L. acidophilus* Ki, e *Bifidobacterium animalis* BB-12 na temperatura de congelamento (-20°C e -80°C) (Sousa et al., 2012).

Vários estudos foram realizados com queijo minas frescal, que revelaram populações de probióticos superiores a 6,0 log UFC/g durante o armazenamento refrigerado do produto por até 21 dias (Buriti et al., 2007).

Apesar de alguns autores demonstrarem que a encapsulação em alginato de cálcio não aumenta a sobrevivência de *L. acidophilus*, ainda assim, este processo assegura maior proteção às células quanto às condições ambientais. Portanto, os sistemas de micropartículas de alginato, não podem ser descartados, uma vez que oferecem várias vantagens, como a de ser atóxico, de fácil de manuseio, biodisponíveis, biocompatível, e de baixo custo (Park & Chang, 2000).

Comparando os resultados da incorporação dos dois micro-organismos na forma livre liofilizada observa-se que a população de *S. boulardii* liofilizado Floratil®, Merck apresentou melhores resultados de viabilidade quando comparada com a população de *L. acidophilus* LA-14 FloraFIT, liofilizado Danisco, visto que a sua população praticamente permaneceu estável, ocorrendo um pequeno declínio de 0,49 (6,39%) ciclos logarítmicos, durante 8 semanas de armazenamento. Diferente da população de *L. acidophilus* que mostrou um decréscimo de 4,45 (53,16%) ciclos logarítmicos, no período de 7 semanas de armazenamento.

Muitos trabalhos demonstram que é pequena a sobrevivência de bactérias probióticas em produtos na forma de células livres (De Vos et al., 2010). Porém, no presente estudo, a incorporação de células liofilizadas, tanto de levedura quanto de bactérias na barra de cereais apresentou concentrações satisfatórias para ação probiótica na 8ª e 6ª semanas, respectivamente. O mesmo não aconteceu nas outras formas de incorporação destes micro-organismos.

Considerando que a dose de micro-organismos probióticos a ser ingerida baseia-se na concentração destes micro-organismos viáveis, a determinação das unidades formadoras de colônias por grama de produto é um parâmetro importante. Deve, então, ser avaliada no decorrer do tempo de prateleira do produto, uma vez que geralmente é aceito, nos produtos probióticos, a concentração mínima de 10⁶CFU/mL ou grama (Kechagia et al., 2013). De acordo com a legislação mais recente da ANVISA, para que um alimento tenha efeito probiótico, é necessário o consumo diário de 10⁸ a 10⁹ micro-organismos viáveis (Brasil, 2008).

Neste estudo foi encontrada concentração celular de *S. boulardii* de 7,24 log UFC/g em 8 semanas e concentração celular de *L. acidophilus* de 7,33 log UFC/g em 6 semanas. Logo, a quantidade de células viáveis em uma barra de cereais de 25g contendo os respectivos micro-organismos liofilizados seria 8,63 log UFC (4,3

x108) e 8,73 log UFC (5,4x 108), o que atende à exigência da legislação brasileira citada, considerando o período de análise dos respectivos produtos. Vale ressaltar que as barras de cereais normalmente encontradas no mercado possuem peso líquido entre 20g e 30g.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se constatar que a incorporação da levedura *S. boulardii* e da bactéria *L. acidophilus* na barra de cereais sob a forma liofilizada manteve maior sobrevivência celular durante o tempo de armazenamento em temperatura ambiente, quando comparada com a incorporação destas células granuladas com lactose e encapsuladas com alginato de cálcio.

Comparando os resultados da incorporação dos dois micro-organismos na forma livre liofilizada observou-se que a população de *S. boulardii* apresentou resultados de viabilidade durante maior período de armazenamento, quando comparado com a população de *L. acidophilus*. No entanto, ambas as formulações atendem às exigências da legislação brasileira no que diz respeito à quantidade de micro-organismos viáveis, apesar dos tempos de armazenamento terem sido diferentes.

Este estudo permite inferir que é possível incorporar micro-organismos probióticos em novas matrizes alimentares, abrindo caminho para novas pesquisas dentro do contexto de alimentos funcionais com atividade probiótica.

AGRADECIMENTO

Pelo apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

ABSTRACT

Stability of microorganisms potentially probiotics in cereal bar - Effect of technique of incorporation

This study aims to develop formulations of cereal bars that contain *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces boulardii* and evaluate the stability of these potentially probiotic microorganisms in the elaborated product during the time of storage (shelf life). Cereal bars were designed containing separately the probiotic agents *S. boulardii* and *L. acidophilus*, both in the lyophilized form, granulated with lactose form and encapsulated in calcium alginate form. The stability of microorganisms during storage time was evaluated. Both, the yeast *S. boulardii* as well as the bacterium *L. acidophilus* showed a higher survival in the lyophilized form when compared with the other forms of incorporation, keeping the count in the range of 7 log UFC/g for eight weeks and in the range 7 log UFC/g for six weeks, respectively. Comparing the results of the incorporation of the two

microorganisms in the free lyophilized form, one could observe that the population of *S. boulardii* showed better results of viability when compared with the population of *L. acidophilus*. This study showed that it is possible to incorporate potentially probiotic microorganisms in cereal bars, preferably in the lyophilized form, in order to provide a higher survival of the microorganisms.

Keywords: Cereal bar. Probiotic. *Saccharomyces boulardii*. *Lactobacillus acidophilus*.

REFERÊNCIAS

Akalin AS, Eris D. Effects of inulin and oligofructose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic Ice cream. *J Food Sci*. 2008; 73(4):184-8.

Albertini B, Vitali B, Passerini N, Cruciani F, Sabatino MD, Rodriguez L, Brigidi P. Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*. *Eur J Pharm Sci*. 2010;40:359-66.

Barreto GPM, Silva N, Silva EM, Botelho L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. *Braz J Food Technol*. 2003;6(1):119-26.

Borges JQ, Ferreira SRSS, Costa GW. Cinética de sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulados em matriz de alginato de cálcio e veiculados em mousse de chocolate. In: 19. Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Recife, 2004. Resumos. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004. p.66

Brasil. Ministério da Saúde. Agência nacional de vigilância sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em julho, 2008. [acesso 2013 janeiro 16]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>.

Buriti FCA, Okazaki TY, Alegro JHA, Saad SMI. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh cheese in comparison with the traditional products. *Arch Latinoam Nutr*. 2007;57:179-85.

Covizzi LG, Giese EC, Gomes E, Dekker RFH, Silva, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas. 2007;28(2):143-60.

De Man JD, Rogosa M, Sharpe ME. A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli*. *J Appl Bacteriol*. 1960;23:130-5.

De Vos P, Faas MM, Spasojevic M, Sikkema J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *Int Dairy J*. 2010; 20(4):292-302.

Food and Agriculture Organization of United Nations, World Health Organization. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of a joint Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health

- Organization Expert Consultation. 2001 [acesso 2012 agosto 12]. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/esn/food/probio_report_en.pdf>.
- Fuller R, editor. Probiotics: the scientific basis. Edinbrugh: Chapman & Hall; 1992.
- Gibson GR, Fuller R. Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. J Nutr. 2000;130:391S-S4.
- Gutkoski LC, Bonamigo JMA, Teixeira DMF, Pedó I. Desenvolvimento de barras de cereais à base de aveia com alto teor de fibra alimentar. Ciênc Tecnol Aliment. 2007; 27(2):355-63.
- Gutkoski LC, Bonamigo JMA, Teixeira DMF, Pedó I. Desenvolvimento de barras de cereais à base de aveia com alto teor de fibra alimentar. Ciênc Tecnol Aliment. 2007; 27(2):355-63
- Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou K, Skarmoutsou N et al. Health benefits of probiotics: a review. ISRN Nutrition. 2013; [acesso 2014 janeiro 29]; Article ID 481651, 7 pages. Disponível em: <http://www.hindawi.com/isrn/nutrition/2013/481651/>. doi:10.5402/2013/481651.
- Macedo LN, Luchese RH, Guerra AF, Barbosa CG. Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. Ciênc Tecnol Aliment. 2008;28(4):935-42.
- Macedo REF, Pflanzler Jr SB, Terra NN, Freitas RJS. Desenvolvimento de embutido fermentado por *Lactobacillus* probióticos: características de qualidade. Ciênc Tecnol Aliment. Campinas. 2008;28(3):509-19.
- Martins EMF, Ramos AM, Vanzela, ESL, Stringheta PC, Pinto CLO, Martins JM. Products of vegetable origin: a new alternative for consumption of probiotic bacteria. Food Res Int. 2013;51:764-70.
- Migowski E, Pugliese BS. Gastrerenterite aguda: por que dose maior de *Saccharomyces boulardii* na fase aguda? Rev Bras Clín Méd. 2009;267-71.
- Pardo S, Galvagno MA, Cerrutti, P. Estudios de laviabilidad frente al congelado de la levedura *Saccharomyces boulardii*: efecto del pré acondicionamiento fisiológico. Rev Iberoam Micol. 2009;26(2):155-60.
- Park JK, Chang HN. Microencapsulation of microbial cells. Biotechnol Adv. 2000;18:303-19.
- Pinto CP, Paulo EM, Mitoshi HK, Pinheiro CR, Uetanabaro APT – Agentes microbianos reguladores da microbiota intestinal humana e animal: uma abordagem geral. Sitientibus Série Ciênc Biol. 2007;7(4):416-23.
- Puupponen-pimia R, Aura AM, Oksman-Caldentey KM, Myllarinen P, Saarela M, Mattila-Sanholm T, Poutanen K. Development of functional ingredients for gut health. Trends Food Sci Technol. 2002;13:3-11.
- Ribeiro EP, Simões LG, Jurkiewicz CH. Desenvolvimento de queijo minas frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentados de ultrafiltração. Ciênc Tecnol Aliment. 2009;29:19-23.
- Rivera-Espinoza Y, Gallardo-Navarro Y. Non-dairy probiotic products. Food Microbiol. 2010;27:1-11
- Roberfroid M. B. Functional food concept and its application to prebiotics. Dig Liver Dis. 2002;34(2):105-10.
- Roberfroid M. B. Inulin-type fructans: functional food ingredients. J Nutr. 2007;137 (11):2493-502.
- Saint-Marc T, Blehaut H, Musial C, Touraine J. AIDS related diarrhea: a double-blind trial of *Saccharomyces boulardii*. Sem Hôsp Paris. 1995;71:735-41.
- Salmerón I, Thomas KE, Pandiella SS. Effect of substrate composition and inoculum on the fermentation kinetics and flavour compound profiles of potentially non-dairy probiotic formulations. LWT – Food Sci Technol. 2014;55:240-7.
- Sanders M. E. Probiotics: considerations for human health. Nutr Rev. 2003;61(3):91-9.
- Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAA. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água. 4. ed. São Paulo: Varela; 2010.
- Siró I, Kápolna B, Lugasi A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance – A review. Appetite. 2008;51:456-67.
- Sousa S, Gomes AM, Pintado MM, Malcata FX, Silva JP, Sousa JM, Costa P, Amaral MH, Rodrigues D, Rocha-Santos TAP, Freitas AC. Encapsulation of probiotic strains in plain or cysteine-supplemented alginate improves viability at storage below freezing temperatures. Eng Life Sci. 2012;12(4):457-65.
- Surawicz CM, Macfarland LV, Greenberg RN, Rubin M, Fekety R, Mulligan ME, Garcia RJ, Brandmaker S, Borjal D, Elmer GW. The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: use of high-dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*. Clin Infect Dis. 2000;31:1012-7.
- Swidsinski A, Baucke VL, Kirsch S, Doerffel Y. Functional biostructure of colonic microbiota (central fermenting área, germinal stock area and separating mucus layer) in healthy subjects and patients with diarrhea treated with *Saccharomyces boulardii*. Rev Gastroenterol Clin Biol. 2010 [acesso 2013 janeiro 16];4:79-92. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0399-8320\(10\)70025-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0399-8320(10)70025-7).

Recebido em 21 de maio de 2014

Aceito em 14 de julho de 2014

