



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

AGNES IZUMI NAGASHIMA

**“DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS EFERVESCENTES
ADICIONADOS DOS PROBIÓTICOS *LACTOBACILLUS
ACIDOPHILUS* E *SACCHAROMYCES BOULARDII*”**

Londrina
2010

AGNES IZUMI NAGASHIMA

**“DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS EFERVESCENTES
ADICIONADOS DOS PROBIÓTICOS *LACTOBACILLUS*
ACIDOPHILUS E *SACCHAROMYCES BOULARDII*”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina como requisito necessário à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Raúl Jorge Hérnan Castro Gómez

Londrina
2010

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

N147d Nagashima, Agnes Izumi

Desenvolvimento de produtos efervescentes adicionados dos probióticos
lactobacillus acidophilus e saccharomyces boulardii. / Agnes Izumi
Nagashima – Londrina, 2010. 78 f.

Orientador: Raúl Jorge Hérnan Castro Gómez

Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade
Estadual de Londrina, Centro de Estudos Sociais Aplicado, Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos, 2010.

1. Viabilidade – Teses. 2. Comprimido – Teses. 3. Desidratação – Teses. 4.
Armazenamento – Teses. I. Nagashima, Agnes Izumi. II. Universidade
Estadual de Londrina. Centro de Estudos Sociais Aplicado. Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

CDU 663.1

AGNES IZUMI NAGASHIMA

**“DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS EFERVESCENTES
ADICIONADOS DOS PROBIÓTICOS *LACTOBACILLUS*
ACIDOPHILUS E *SACCHAROMYCES BOULARDII*”**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Raúl Jorge Héran Castro Gómez
(orientador)
UEL – Londrina - Pr

Profa. Dra. Claudia Dorta
FATEC – Marília – SP

Profa. Dra. Marcela Maria Baracat
UEL – Londrina - Pr

Londrina, 03 de setembro de 2010.

A Deus, meu guia e protetor;
Aos meus pais, Getúlio e Michiko, pela vida, amor, dedicação e incentivo;
À minha irmã, Luciene, pelo amor, compreensão e apoio.

"Assim, depois de muito esperar, um dia como qualquer outro decidi triunfar.
Decidi não ficar à espera das oportunidades e fui procurá-las.
Decidi ver cada problema como a oportunidade de encontrar uma solução.
Decidi ver cada deserto como a oportunidade de encontrar um oásis.
Decidi ver cada noite como um mistério a resolver.
Decidi ver cada dia como a oportunidade de ser Feliz.
Naquele dia descobri que o meu único rival eram apenas as minhas debilidades e
que estas são a única e melhor forma de me superar.
Naquele dia deixei de ter medo de perder e comecei a ter medo de não ganhar.
Descobri que não era o melhor e que talvez nunca o tenha sido.
Deixou de me importar quem ganhara ou quem perdera.
Agora simplesmente me importa ser melhor que ontem.
Aprendi que o difícil não é chegar ao topo, mas sim nunca deixar de subir.
Aprendi que o maior sucesso que posso alcançar é o ter direito de chamar a
alguém de "amigo".
Descobri que o amor é mais do que uma simples paixão.
O amor é uma filosofia de vida.
Naquele dia deixei de ser o reflexo dos meus poucos sucessos alcançados e
comecei a ser a minha própria luz do meu presente.
Aprendi de que nada serve ser luz se não for para iluminar também o caminho da
Humanidade.
Naquele dia decidi mudar tanta coisa.
Aprendi que os sonhos são apenas para transformar em realidade e desde esse
dia que não durmo para descansar.
Agora apenas durmo para sonhar."

(Walt Disney)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, por Ele sempre me proteger, me guiar e me iluminar em todos os passos da minha vida, por Ele ser tão presente;

Ao Prof. Dr. Raúl Jorge Hérnan Castro Gómez pela orientação, ensinamentos, paciência e incentivos durante todo desenvolvimento do trabalho. Por ele ser esse orientador que eu tanto admiro – como orientador, professor e pessoa, muito especial na minha vida;

À Universidade Estadual de Londrina (UEL) pela oportunidade de realizar meu mestrado e pela infra-estrutura disponibilizada e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro;

À minha família, meu *tudo* na vida, pelo amor eterno e incondicional. Pelo carinho e pela preocupação; pelo colo e pelas broncas; pela educação e pela disciplina; pelos princípios morais, pelas alegrias, pela compreensão; por sempre estar ao meu lado, por sempre me apoiar, me guardar, me ensinar, não importa o esforço e o sacrifício pela minha felicidade. Porque sem vocês eu nada seria. Pai, Mãe e minha Irmã: eu amo vocês para sempre;

A Profa. Dra. Marcela Maria Baracat pelo apoio e ensinamento na área de produção de comprimidos;

À Profa. Dra. Claudia Dorta pelos ensinamentos e confiança que tanto contribuíram para minha formação profissional;

Ao Paulo Eduardo Pansiera, pela colaboração no desenvolvimento do trabalho, convívio e amizade, que foi muito importante e a Giselle Aparecida Nobre Costa pela cooperação e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho;

Aos funcionários Ciro Alves e Irandi Luvizeto, do LPM, pela ajuda na produção e testes dos comprimidos e ao Nilson de Jesus Carlos e Jurandir Pereira Pinto, pela ajuda na liofilização dos microrganismos;

À Profa. Dra. Sandra Garcia e à Profa. Dra. Lucia Helena Miglioranza pela participação na minha banca de qualificação, pelas correções e sugestões que foram muito úteis;

Aos docentes e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos pelos ensinamentos e auxílio;

Aos meus parentes, em especial minhas avós Mitico e Tomoko, tios e primos, em especial a tia Lucila, tia Miyuki, tio Hélio e tio Shinji, que me apoiaram desde o começo e sempre torceram por mim;

Às minhas queridas amigas Fernanda P. B. Darpossolo, Sandra Zago, Alessandra Pereira e Giselle N. Onuki pela amizade verdadeira e compreensão;

Aos meus colegas do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos, em especial aos amigos Rafael Mizubuti Brito, Alessandra Tsuruda, Luiz Morioka, Carol Calliari, Rodrigo A. L. Santos, Angélica Ishikawa, Thiago Montagner, Luiz Gustavo A. Aristides, Henrique Rett, Isabella Lima, Eduardo Baptista, Cássia Takabayashi, Breno Silveira, Elvis Martins, Flávia Montanuci, pela convivência e amizade;

Ao Dr. Ademir Assis Henning, Antonio R. Melchiades e Vilma Stroka, pela compreensão para realização deste trabalho;

Ao meu amado escritor José Roberto Torero, por sempre me dar força e estímulo, seja direta ou indiretamente, quando preciso;

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e para que essa etapa da minha vida pudesse ser concretizada.

NAGASHIMA, Agnes Izumi. **Desenvolvimento de produtos efervescentes adicionados dos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Saccharomyces boulardii***. 2010. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina , 2010.

RESUMO

Probióticos são microrganismos vivos, que administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro, sendo sua influência benéfica sobre a microbiota intestinal humana, incluindo fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos. Assim, este trabalho apresentou como objetivo desenvolver produtos efervescentes com os microrganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Saccharomyces boulardii* (comprimido, pó e ingrediente), identificar a melhor formulação em função da viabilidade dos microrganismos probióticos, além do cultivo e multiplicação dos mesmos e sua desidratação. Também se analisou as propriedades físicas do comprimido (força de compressão aplicada, peso médio, dureza e friabilidade) e se avaliou a viabilidade dos microrganismos no processo de fabricação, no trato gastrointestinal e sua estabilidade no armazenamento. O pó e o ingrediente probióticos efervescentes mantiveram estabilidade e viabilidade durante o período de armazenamento. Já o comprimido, além de exigir maior número de equipamentos e etapas de produção, o efeito de compressão afetou a viabilidade dos microrganismos.

Palavras – chave: Viabilidade. Comprimido. Desidratação. Armazenamento.

NAGASHIMA, Agnes Izumi. **Development of effervescent products added of probiotics *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces boulardii***. 78 p. 2010. Dissertation (Master's degree in Food Science) – Londrina State University, Londrina- PR, 2010.

ABSTRACT

Probiotics are live microorganisms, which administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host, and its beneficial effect on human intestinal microbiota, including factors such as antagonism, competition and immunological effects. The objective of this study was developing of effervescent products with the probiotics *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces boulardii* (tablet, powder and an ingredient), identify the best formulation based on the viability of probiotic microorganisms, as well as growing and multiplying them and their dehydration. Also was examined the physical properties of tablet (compressive force applied, average weight, hardness and friability) and was evaluated the viability of microorganisms in the manufacturing process, in gastrointestinal tract and its storage stability. The effervescent, ingredient and powder, with probiotics, both maintained stability and viability during the storage period. Already the tablet required more equipment and production stages and the effect of compression affect the viability of microorganisms.

Key – words: Viability. Tablet. Dehydration. Storage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos de ação de <i>Saccharomyces boulardii</i> em <i>Clostridium difficile</i> , <i>Vibrio cholerae</i> e EPEC <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica, causadores de diarreia	25
Figura 2 – Esquema de obtenção de <i>L. acidophilus</i> em pó.....	33
Figura 3 – Esquema de obtenção de <i>S. boulardii</i> em pó.....	35
Figura 4 – Pó efervescente probiótico.....	56
Figura 5 – Comprimido efervescente probiótico na compressora	57
Figura 6 – Placa com MRS ágar inoculado com <i>Lactobacillus acidophilus</i> incubado a 37 °C (A) e placas de BDA (batata dextrose Agar) (B), BDA + cloranfenicol (C), MEA (malt extract Agar) (D), MEA acidificado (E) <i>Lactobacillus</i> inoculados com <i>L. acidophilus</i> incubado a 25 °C.....	76
Figura 7 – Placas com MRS ágar inoculadas com <i>Lactobacillus acidophilus</i> (A), <i>Saccharomyces boulardii</i> (B), <i>L. acidophilus</i> + <i>S. boulardii</i> (C) e <i>L. acidophilus</i> + <i>S. boulardii</i> + 666 ppm de cetoconazol (D), todos incubados a 37 °C	77
Figura 8 – Placas com MRS ágar inoculada com <i>Saccharomyces boulardii</i> (A) e com <i>S. boulardii</i> + cetoconazol 666 ppm (B), incubados a 37 °C	78
Figura 9 – Placas com MRS ágar inoculada com <i>Lactobacillus acidophilus</i> (A) e com <i>L. acidophilus</i> + cetoconazol 666 ppm (B), incubados a 37 °C	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	22
Tabela 2 – Ingredientes e níveis utilizados no desenho experimental 2 (9-5).....	37
Tabela 3 – Desenho Experimental 2(9-5): Formulações codificadas para avaliação dos efeitos dos componentes (em g) sobre a viabilidade dos microrganismos probióticos	38
Tabela 4 – Viabilidade de <i>Lactobacillus acidophilus</i> liofilizado, armazenados aos zero, 15, 30, 45 e 60 dias, a 5 °C e 60 % de umidade relativa.....	44
Tabela 5 – Perda de viabilidade do <i>Lactobacillus acidophilus</i> durante armazenamento a 5°C por um período de 60 dias.....	44
Tabela 6 – Viabilidade de <i>Saccharomyces boulardii</i> liofilizado, armazenados a 5 °C e 60 % de UR	45
Tabela 7 – Perda de viabilidade do <i>Saccharomyces boulardii</i> durante armazenamento a 5°C durante 60 dias.....	45
Tabela 8 – Viabilidade de <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Saccharomyces boulardii</i> desidratados em estufa a 40 °C, armazenados a 5 °C e 60 % de umidade relativa.....	46
Tabela 9 – Perda de viabilidade de <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Saccharomyces boulardii</i> durante armazenamento a 5 °C durante 60 dias	46
Tabela 10 – Viabilidade de <i>Lactobacillus acidophilus</i> após 60 dias de armazenamento a 5°C e 60% UR.....	48
Tabela 11 – Viabilidade de <i>Saccharomyces boulardii</i> após 60 dias de armazenamento a 5 °C e 60 % UR	49
Tabela 12 – Efeito dos ingredientes(em g) utilizados na formulação do comprimido e do pó na viabilidade dos microrganismos probióticos (UFC).....	52
Tabela 13 – Efeitos dos ingredientes da formulação no crescimento da <i>Saccharomyces boulardii</i>	53

Tabela 14 – Efeitos dos ingredientes da formulação no crescimento do <i>Lactobacillus acidophilus</i>	54
Tabela 15 – Formulação do pó efervescente probiótico (produzidos por liofilização em solução 10 % de leite desnatado)	55
Tabela 16 – Formulação laboratorial do comprimido efervescente probiótico (produzidos por liofilização em solução 10 % leite desnatado)	56
Tabela 17 – Formulação Industrial do comprimido efervescente probiótico (produzidos por desidratação em estufa na presença de amido de milho)	58
Tabela 18 – Viabilidade de <i>L. acidophilus</i> e <i>S. boulardii</i> no pó efervescente probiótico, produzidos por liofilização com leite desnatado a 10 % em condições de laboratório e armazenados aos zero, 15, 30, 45 e 60 dias a 25 °C.....	59
Tabela 19 – Viabilidade de <i>L. acidophilus</i> e <i>S. boulardii</i> no comprimido efervescente probiótico (produzidos por liofilização com leite desnatado 10 %) e armazenados a 25°C durante 60 dias	59
Tabela 20 – Viabilidade de <i>L. acidophilus</i> e <i>S. boulardii</i> comerciais do pó efervescente probiótico, armazenados a 25 °C durante 60 dias	59
Tabela 21 – Peso médio em gramas e dureza média em Newton (N) de 10 comprimidos efervescente probiótico	60
Tabela 22 – Caracterização Física para o Comprimido Efervescente Probiótico	61
Tabela 23 – Efeito da força de compressão na viabilidade dos probióticos.....	62
Tabela 24 – Viabilidade de <i>L. acidophilus</i> e <i>S. boulardii</i> , aos zero, 30, 60, 90 e 120 min de contato com suco gástrico artificial	64
Tabela 25 – Viabilidade de <i>L. acidophilus</i> e <i>S. boulardii</i> durante 150 min de contato com suco intestinal artificial.....	64
Tabela 26 – Estabilidade de <i>L. acidophilus</i> e <i>S. boulardii</i> em refresco comercial durante 48 h.....	66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 JUSTIFICATIVA	16
3 OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVO GERAL	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
4.1 PROBIÓTICOS	18
4.2 BACTÉRIAS LÁCTICAS	20
4.2.1 <i>Lactobacillus Acidophilus</i>	21
4.3 LEVEDURAS	22
4.3.1 <i>Saccharomyces Boulardii</i>	24
4.4 VIABILIDADE DE MICRORGANISMOS	25
4.5 DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS PROBIÓTICOS	26
4.6 COMPRIMIDOS	27
4.7 EXCIPIENTES	29
5 MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1 INFRA - ESTRUTURA	31
5.2 MICRORGANISMOS	31
5.3 EXCIPIENTES	31
5.4 PRODUÇÃO DE MICRORGANISMOS EM PÓ	32
5.4.1 Ativação, Obtenção da Biomassa e Produção de <i>L.Acidophilus</i> em Pó	32
5.4.2 Ativação, Obtenção da Biomassa e Produção de <i>S. Boulardii</i> em Pó	34
5.5 CONTAGEM DE BACTÉRIA LÁCTICA E LEVEDURA	36
5.6 DESENVOLVIMENTO DOS PRODUTOS PROBIÓTICOS EFERVESCENTES EM PÓ	36
5.6.1 Comprimido e Pó Efervescentes Probióticos	36

5.6.1.1 Viabilidade dos microrganismos.....	39
5.6.1.2 Propriedades físicas dos comprimidos.....	39
5.6.1.2.1 Peso médio.....	39
5.6.1.2.2 Dureza.....	39
5.6.1.2.3 Friabilidade.....	40
5.6.1.2.4 Desintegração.....	40
5.6.1.2.5 Estabilidade no armazenamento.....	40
5.6.1.3 Efeito da força de compressão na viabilidade dos probióticos.....	41
5.6.1.4 Efeito do trato gastrointestinal na viabilidade dos probióticos.....	41
5.7 DESENVOLVIMENTO DE INGREDIENTE EM PÓ EFERVESCENTE PROBIÓTICO.....	41
5.7.1 Estabilidade do Ingrediente em Pó Efervescente Probiótico.....	42
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
6.1 PRODUÇÃO E ESTABILIDADE DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS NO ARMAZENAMENTO.....	43
6.2 DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS EFERVESCENTES PROBIÓTICOS.....	51
6.2.1 Formulação do Pó e Comprimido Efervescentes Probióticos.....	55
6.2.2 Viabilidade dos Microrganismos nos Produtos Efervescentes Probióticos.....	58
6.2.3 Propriedades Físicas dos Comprimidos.....	60
6.2.4 Efeito da Força de Compressão na Viabilidade dos Probióticos.....	62
6.2.5 Efeito do Trato Gastrointestinal na Viabilidade dos Probióticos.....	63
6.3 DESENVOLVIMENTO DE INGREDIENTE EFERVESCENTE PROBIÓTICO.....	65
7 CONCLUSÕES.....	67
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ANEXO.....	75
ANEXO A.....	76

1 INTRODUÇÃO

Probióticos são produtos ou suplementos contendo microrganismos ou componentes microbianos viáveis que, quando ingeridos, alteram a microbiota presente e exercem efeitos benéficos à saúde. Podem influenciar a fisiologia intestinal, direta ou indiretamente, por meio da modulação da microbiota endógena ou o sistema imune intestinal. Entre os diversos gêneros que integram este grupo, destacam-se *Bifidobacterium*, *Saccharomyces* e *Lactobacillus*, em particular, a espécie *Lactobacillus acidophilus*.

Lactobacillus acidophilus é uma bactéria láctica amplamente utilizada por ser reconhecido seu efeito probiótico, sendo seguro, e apresenta efeito antagônico contra patógenos, tolerância a ácido e sais biliares e aderência ao epitélio intestinal, prevenção de diarreia associada a antibióticos e produção de substâncias antimicrobianas.

Saccharomyces boulardii é uma levedura probiótica importante para prevenção ou tratamento de distúrbios gastrointestinais, com efeitos farmacodinâmicos semelhantes aos efeitos protetores da microbiota intestinal normal. Libera substâncias que inibem certas toxinas bacterianas e seus efeitos patogênicos são imunoestimulantes e antiinflamatórios na mucosa intestinal.

A viabilidade de probióticos na matriz de alimentos depende de muitos fatores, tais como pH, temperatura da estocagem e presença de microrganismos competidores e inibidores.

Após a sua ingestão, os microrganismos probióticos devem ser capazes de sobreviverem às condições de estresse presentes no trato gastrointestinal, como suco gástrico, presença de sais biliares e enzimas digestivas e manter sua viabilidade e atividade metabólica no intestino para exercerem os efeitos benéficos aos hospedeiros.

Em relação aos desafios tecnológicos, quanto à produção industrial e armazenamento, os microrganismos devem manter-se estáveis e viáveis em níveis satisfatórios durante todo o prazo de validade do produto. No entanto, durante a secagem, como no caso da liofilização, ocorre perda em sua viabilidade, sendo muitas vezes necessária a utilização de protetores nesse processo.

A maioria dos produtos probióticos apresenta-se disponível na forma líquida ou semisólida, e principalmente como produtos lácteos – leites fermentados, queijos e iogurtes. A aplicação de culturas probióticas em produtos que não são derivados do leite representa inovação. Outros produtos oferecem potencial para a administração de culturas probióticas, como produtos a base de soja, sorvete, produtos nutritivos em pó, cápsulas e comprimidos. Estes têm vantagens por apresentar dosagens exatas, facilidade de administração, boa aceitação junto ao consumidor e aptidão para a produção em grande escala.

2 JUSTIFICATIVA

A estabilidade das células probióticas quanto a sua viabilidade é um dos mais importantes fatores para obter melhor eficiência para proteção das células ao longo do tempo de validade de um produto.

A combinação de probióticos com diferentes mecanismos de ação é interessante para ampliar a proteção da preparação bioterapêutica.

A maioria dos produtos probióticos disponíveis no mercado é composto por produtos lácteos. Mais estudos devem ser realizados a fim de se obter maior variedade de produtos que apresentem capacidade probiótica, com manutenção de sua viabilidade após processo de produção e sua ingestão.

Assim, pesquisas relacionadas à inovação tecnológica são válidas, e o presente trabalho, uma tentativa de colocar à disposição no mercado opções de produto probiótico efervescente de consumo diário sem restrição que poderá ser adicionado a qualquer produto líquido, conferindo-lhe sabor agradável, além de promover a ingestão, com benefícios na saúde do consumidor.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver produtos probióticos efervescentes com *Lactobacillus acidophilus* e *Saccharomyces boulardii*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a viabilidade de *L. acidophilus* e *S. boulardii* após sua desidratação e produção de um pó utilizando liofilizador ou estufa;
- Verificar a viabilidade dos probióticos durante armazenamento de dois meses a 5 °C;
- Testar a influência dos excipientes na viabilidade dos microrganismos em estudo;
- Determinar parâmetros físicos (peso, dureza, tempo de desintegração e friabilidade) do comprimido probiótico efervescente;
- Avaliar a influência da força de compressão na produção dos comprimidos na viabilidade da bactéria láctica e levedura;
- Observar a viabilidade dos microrganismos após armazenamento do pó e dos comprimidos por dois meses a 25 °C;
- Testar sobrevivência dos microrganismos no pó em condições gastrointestinais simuladas.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 PROBIÓTICOS

O termo „probiótico“, de origem grega, significa „para a vida“, e tem sido utilizado das maneiras mais diversas ao longo dos últimos anos. Uma definição de probiótico muito utilizada e completa é a proposta por Havenaar e Huis in’t Veld (1992): “os agentes probióticos são definidos como microrganismos viáveis (o que inclui bactérias lácticas e leveduras na forma de células liofilizadas ou de produto fermentado) que exibem um efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro após ingestão, devido à melhoria das propriedades da microbiota endógena”.

Baseada nessa definição, Schrezenmeir e de Vrese (2001) propuseram a seguinte definição para probiótico: “preparação de ou produto contendo microrganismos viáveis definidos, em número suficiente, que alteram a microflora (por implantação ou colonização) em um compartimento do hospedeiro e exerce efeitos benéficos a sua saúde”. Entretanto, a definição atualmente aceita internacionalmente é que são microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Food and Agriculture Organization of United Nations; World Health Organization, 2001).

O consumo regular de microrganismos probióticos viáveis pode ser eficaz na melhoria da tolerância à lactose, redução dos níveis de colesterol, controle em infecções gastrointestinais causadas por vírus ou bactérias. Além disso, foi relatado que a colonização de algumas cepas de probióticos pode reduzir a severidade da diarreia aguda em crianças e diarreia em pacientes com câncer ginecológico tratados com radioterapia pélvica (GIRALT et al., 2006; KLAYRAUNG et al., 2009).

Bactérias e leveduras são os microrganismos mais comuns utilizados como probióticos, mas diferem fundamentalmente nos mecanismos de ação, metabolismo e resistência a antibióticos. Essencialmente, três gêneros de bactérias e um de levedura são a base para a maioria das preparações: *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Lactobacillus* e *Saccharomyces*. Quatro mecanismos são atribuídos aos probióticos para explicar seu efeito protetor: imunomodulação do

hospedeiro (mecanismo atribuído tanto às bactérias lácticas como às leveduras), antagonismo através da produção de substâncias inibidoras ou tóxicas aos patógenos e competição com o patógeno por adesão aos sítios ou fontes nutricionais (atribuídos às bactérias lácticas) e inibição da produção ou ação da toxina bacteriana (atribuído à levedura) (FILHO-LIMA et al., 2000).

A grande vantagem da terapia com probióticos é a ausência de efeitos secundários, como a seleção de bactérias resistentes. Os efeitos benéficos destes microrganismos são basicamente os mesmos da microbiota normal do corpo humano, utilização em grande quantidade daqueles que possuem eficácia comprovada, podendo ser constituintes normais da microbiota, como bifidobactérias e lactobacilos, ou não, como a levedura *S. boulardii*. (MARTINS, 2005).

Para que um probiótico possa expressar todas as suas potencialidades benéficas quando ingerido, é necessário que ele chegue viável, metabolicamente ativo e em quantidade suficiente no ecossistema em que se espera que vá atuar. Contudo, para poder sobreviver por longo tempo durante o armazenamento até sua ingestão, um probiótico deve ser conservado numa forma onde seu metabolismo seja bastante reduzido ou até suspenso. Esse estado de dormência deve ser revertido rapidamente quando o probiótico chegar no ecossistema digestivo. Além de permitir a manutenção da viabilidade por longo período de tempo, a liofilização tem como outra vantagem a de impedir, pela baixa atividade de água, toda possibilidade de contaminação posterior do produto. (MARTINS et al., 2006).

Uma vez ingeridas, uma rápida e eficiente reativação das células probióticas é necessária para que elas possam demonstrar os seus efeitos benéficos ao longo da maior porção possível do trato digestivo, já que o local de atuação e/ou invasão dos agentes patogênicos varia do intestino delgado (*Salmonella*) até o cólon (*Shigella*). Diante dos fluxos que percorrem o trato digestivo, os probióticos se comportam, portanto, como marcadores de trânsito e tem relativamente pouco tempo para sua reativação e posterior atuação (MARTINS et al., 2006).

4.2 BACTÉRIAS LÁCTICAS

Bactérias lácticas são cocos ou bastonetes *Gram*-positivos, não esporogênicos, fermentadores, produtores de ácido láctico como resultado final da fermentação de carboidratos, catalase negativos e apresentam metabolismo e características fisiológicas semelhantes. Os gêneros tradicionais são: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Carnobacterium* (AXELSSON, 1993; SCHLEIFER et al., 1995).

Muitas espécies de bactérias lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*), utilizadas na produção de alimentos fermentados, têm apresentado antagonismo a outras bactérias, incluindo as do mesmo gênero e/ou patógenos (McMULLEN; STILES, 1996).

A capacidade de produzir grande quantidade de ácidos orgânicos (fundamentalmente ácido láctico), por fermentarem os carboidratos presentes nos alimentos e conseqüentemente reduzirem o pH, é o fator primário em que se baseia a atividade antimicrobiana das bactérias lácticas (MAGRO et al., 2000). Além disso, as bactérias lácticas têm capacidade de produzir outras substâncias inibitórias, tais como: peróxido de hidrogênio, diacetil, metabólitos de oxigênio, entre outras (PIARD; DESMAZEAUD, 1991).

Além de inibir o crescimento de patógenos nos alimentos fermentados, acredita-se que as bactérias lácticas proporcionem efeitos benéficos à saúde. As bactérias do ácido láctico são as principais representantes dos probióticos em alimentos e produtos farmacêuticos. Muitos alimentos, incluindo leite não fermentado, leite fermentado, iogurte, culturas secas, bebidas e doces contendo culturas vivas de bactérias lácticas promotoras de benefícios à saúde são denominados probióticos (RICHARDSON, 1996).

Bactérias lácticas inibem o desenvolvimento de diversos microrganismos indesejáveis e patogênicos nos alimentos e, assim, além de lhes conferir características sensoriais desejáveis, estendem a vida útil e podem oferecer efeito benéfico. Essa ação se atribui aos metabólitos desses microrganismos (ácidos orgânicos, H₂O₂ etc.) e às substâncias produzidas como antibióticos e bacteriocinas. Estas são, em geral, pequenas proteínas catiônicas, heterogêneas e hidrofóbicas, que apresentam de 20 a 60 resíduos de aminoácidos, ponto isoelétrico

elevado, características anfipáticas; variam consideravelmente quanto ao microrganismo produtor, ao espectro de ação, ao peso molecular e às suas propriedades bioquímicas. Nesse sentido, vários estudos têm indicado que as bacteriocinas são uma das principais substâncias responsáveis pela ação antimicrobiana mediada pelas bactérias lácticas (SANTOS, 1993; VERHEUL et al., 1997).

As bactérias lácticas têm grande importância econômica, já que de forma natural ou adicionada intencionalmente, desempenham importante papel na fermentação de grande variedade de alimentos. Assim, a utilização de bactérias lácticas na elaboração de alimentos tem crescido nos últimos tempos. Atualmente, são conhecidos alguns dos efeitos que a fermentação exerce sobre a conservação de produtos e, por isso, é importante conhecer, dirigir e melhorar esses processos, visando à obtenção de produtos de melhor qualidade. As bactérias lácticas são capazes de converter açúcares, ácidos orgânicos, proteínas ou gorduras em componentes de aroma e sabor e também podem contribuir para melhorar a textura e a viscosidade de produtos fermentados por meio da síntese de exopolissacarídeos (RUAS-MADIEDO et al., 2002).

4.2.1 *Lactobacillus Acidophilus*

Lactobacillus acidophilus é uma bactéria láctica comum, em formato de bastonete, que se encontra na forma de células livres, aos pares ou em cadeias curtas, tamanho típico de 0.6-0.9 µm de largura e 1.5-6.0 µm de comprimento, Gram-positiva, catalase negativa, pouco tolerante à salinidade do meio, anaeróbia a microaerófila, com o crescimento em meios sólidos favorecido por anaerobiose ou pressão reduzida de oxigênio e homofermentativa.

É uma das principais bactérias benéficas encontradas no intestino humano e animal e na vagina, que se adere a parede intestinal, cobrindo o revestimento do intestino, não deixando espaço para organismos prejudiciais, prevenindo contra microrganismos patogênicos. Na tabela 1, podem-se observar algumas características de *L. acidophilus*.

São bactérias fracas formadoras de ácidos e crescem em

temperatura entre 20 a 48 °C, sendo a temperatura ótima de crescimento a 37 °C. É um microrganismo probiótico que apresenta um conjunto significativo de apoio à pesquisa, como modulação benéfica da atividade metabólica de bactérias intestinais, prevenção de diarreia associada a antibióticos, preservação da integridade intestinal durante radioterapia, estimulação da resposta imune sistêmica, aumento da biodisponibilidade de ferro, redução bacteriana vaginal e produção de substâncias antimicrobianas que atuam contra outras bactérias, vírus, protozoários e fungos (CHALLEM, 1995 apud TENNEY, 1996; FRANCO; LANDGRAF; DESTRO, 1996; GOMES; MALCATA, 2002; MOUNTZOURIS et al., 2009).

Na área farmacêutica, são formulados em comprimidos, sendo capazes de proteger-se de condições desfavoráveis e fornecer substâncias ativas no trato intestinal. Com excipientes adequados e boa compressão, pode-se garantir alta estabilidade de *Lactobacillus acidophilus* em suco gástrico artificial (STADLER; VIERNSTEIN, 2003).

Tabela 1 – Características de *Lactobacillus acidophilus* (adaptado de Gomes e Malcata, 2002).

Característica	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Fisiologia	Microaerófilo
Composição da parede celular:	
- tipo de peptidoglicano	Lys-D Asp
- composição fosfolipídio/ácido teicóico	Glicerol
Composição base DNA (mol % guanina + citosina)	34-37
Configuração do ácido láctico	DL
Metabolismo de açúcares	Homofermentativo

4.3 LEVEDURAS

As leveduras são empregadas, com grande frequência, na obtenção

de produtos de consumo diário, entre eles o pão e as bebidas alcoólicas, destacando-se as fermentadas e aquelas posteriormente destiladas. Caracterizam-se por apresentarem alta resistência às condições de ambiente, pH, presença de sais e temperatura de até, aproximadamente 35 °C, alta taxa de reprodução, podendo se reproduzir sexuadamente, formando esporos, ou por reprodução assexual, envolvendo brotamento, gemulação ou fissão binária (BLUMER, 2002).

Esses fungos apresentam diversas propriedades importantes como não produção de esporos alergênicos ou micotoxinas como os bolores, ou metabólicos antibióticos como os produzidos por antagonistas bacterianos. As leveduras têm geralmente maior resistência às bruscas alterações ambientais (gradientes de pH, alterações osmóticas, etc.) quando comparadas a bactérias lácticas, assim como menor necessidade de nutrientes que resultem em reduções de custos nos processos de produção. E podem colonizar superfícies secas por longos períodos de tempo. Utilizam rapidamente nutrientes disponíveis, sendo capazes de crescerem em várias fontes de carbono e de fornecer grande quantidade de biomassa em tempo relativamente pequeno. Além disso, as células das leveduras contêm quantidades elevadas de vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais e efeito benéfico quando adicionadas ao alimento (BAPTISTA, 2001).

Determinadas leveduras apresentam o fator “killer”, um peptídeo tóxico liberado no meio de cultivo capaz de inibir o crescimento de outros microrganismos sendo detectado em diversos gêneros como *Saccharomyces* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Debaryomyces* spp., *Hansenula* spp., *Kluyveromyces* spp., *Pichia* spp., *Torulopsis* spp (PHILLISKIRK; YOUNG, 1975).

Todas as toxinas “killer” detectadas consistiram de proteínas ácidas com ponto isoelétrico aproximado de pH 4,0, sendo a maioria com massa molecular entre 10-20 kDa. (RADLER et al., 1993). Porém, pouco se conhece ainda sobre o mecanismo de ação. Evidências indicaram atuação na membrana de células sensíveis, reduzindo o pH intracelular e causando conseqüente extravasamento de íons potássio e ATP, entre outros . O transporte de aminoácidos e a bomba de prótons também foram inibidos sendo que todos os efeitos citados constituíram no indicativo de aumento na permeabilidade do próton em células sensíveis (DE LA PEÑA et al., 1981; SKIPPER; BUSSEY, 1977). Muitas toxinas de leveduras são glicoproteínas formadoras de prótons capazes de originar canais iônicos (MARTINAC et al., 1990), resultando em desestabilização do potencial eletroquímico

da membrana e eventual morte celular.

4.3.1 *Saccharomyces Boulardii*

Saccharomyces boulardii é uma levedura natural e foi isolada da casca da lichia em meados de 1920, na Indochina, pelo microbiologista francês Henri Boulardi. A partir de estudos taxonômicos e baseado em diferentes métodos de tipagem molecular, *Saccharomyces boulardii* apresentou características fisiológicas, bioquímicas e macro e micromorfológicas típicas de *Saccharomyces cerevisiae*, além de sequências do domínio D1/D2 do 26S rDNA idênticos, podendo ser considerado como membro de *Saccharomyces cerevisiae* (VAN DER AA KÜLE; JESPERSEN, 2003).

Esse microrganismo é utilizado para tratar ou prevenir várias enfermidades gastrointestinais, existindo evidência sobre sua função na prevenção da diarreia associada ao uso de antibiótico em pacientes de alto risco e tratamento de infecções intestinais recorrentes causadas por *Clostridium difficile*. Produz efeitos farmacodinâmicos semelhantes aos efeitos protetores da microbiota intestinal normal (BUTS, 2005).

Seu mecanismo de ação está parcialmente esclarecido: liberação *in vivo* de substâncias que inibem certas toxinas bacterianas e seus efeitos patogênicos, tróficos, antiseoretos, imunoestimulantes e antiinflamatórios na mucosa intestinal. Ao ser administrado regularmente por via oral, não se instala no trato gastrointestinal, mantendo sua forma viável em um nível estável de concentração a partir do terceiro dia de administração, desaparecendo das fezes 48 h depois de interromper a terapia (BUTS, 2005).

Na figura 1 estão representados alguns dos mecanismos de ação da levedura *Saccharomyces boulardii* contra microrganismo patógenos causadores de diarreia, *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae* e EPEC *Escherichia coli* enteropatogênica. O *S. boulardii* produz protease que inibe as toxinas A e B do *Clostridium difficile* e auxilia no aumento da imunoglobulina A antitoxina A. Além disso, a levedura inibe a toxina colérica produzida por *Vibrio cholerae* inibindo a

adenilato ciclase. Também, a *S. boulardii* pode inibir a fosforilação protéica ativada pela EPEC (GOULET, 2009).

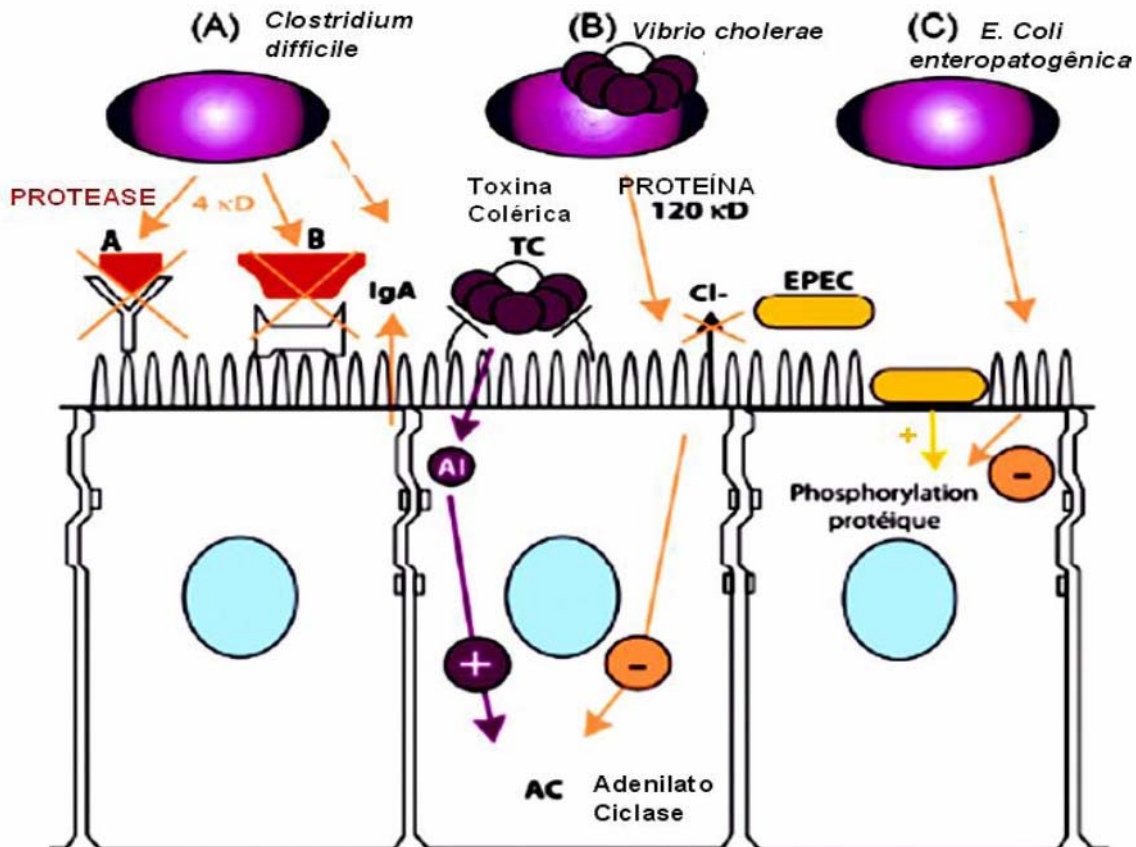


Figura 1 – Mecanismos de ação de *Saccharomyces boulardii* em *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae* e EPEC *Escherichia coli* enteropatogênica, causadores de diarreia (GOULET, 2009 modificado).

4.4 VIABILIDADE DE MICRORGANISMOS

Segundo Kailasapathy e Rybka (1997) e Hamilton-Miller, et al. (1999), as culturas probióticas podem não sobreviver em número suficientemente alto quando submetidas a determinadas condições, como por exemplo, o armazenamento em baixas temperaturas e a passagem pelo trato gastrointestinal humano. São considerados alimentos probióticos aqueles que contenham pelo menos 10^6 UFC (unidades formadoras de colônia) de células viáveis/g ou mL de produto, disponíveis todo o tempo de vida-útil.

Porém, vários fatores como acidificação do produto final, tipos de ácidos produzidos, o teor de oxigênio presente durante o armazenamento, os compostos antimicrobianos e a perda de nutrientes do leite podem reduzir sua viabilidade e, conseqüentemente, prejudicar suas propriedades probióticas. Para se tentar minimizar este tipo de problema pode-se citar o uso do probiótico liofilizado, a utilização dos métodos de microencapsulação ou ainda da tecnologia da Engenharia Genética, através do desenvolvimento de linhagens mais específicas a determinadas condições (SHAH et al., 1995; SANDHOLM et al., 2002).

Além disso, é desejável quanto ao processamento de alimentos que as cepas sejam apropriadas para a produção industrial em larga escala, devendo ser resistentes nas condições de preparo, seja por liofilização, secagem por *spray drying* ou estufa. Assim, a sobrevivência das bactérias probióticas no produto alimentício é fundamental, necessitando alcançar populações suficientemente elevadas (tipicamente acima de 10^6 UFC/mL ou g) para ser de importância fisiológica ao consumidor (JELEN; LUTZ, 1998; SAAD, 2006).

4.5 DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS PROBIÓTICOS

O propósito da administração de produtos probióticos é resultar em microbiota intestinal balanceada, a qual, por sua vez, terá um impacto favorável sobre a saúde do consumidor. Uma seleção adequada de cepas deve ser conduzida para o processamento de produtos alimentícios probióticos.

Essa seleção garantir a sobrevivência desses microrganismos à passagem pelo trato gastrointestinal, após a manutenção de sua viabilidade no próprio produto-alvo, durante a sua elaboração e o seu armazenamento, bem como conferir propriedades tecnológicas adequadas a esse produto.

O veículo alimentício escolhido para a incorporação de cepas probióticas deve ser cuidadosamente estudado para a seleção conveniente do par cepa probiótica-veículo, particularmente nos produtos fermentados, para os quais a multiplicação de probióticos pode resultar em características não peculiares ou mesmo indesejáveis ao produto. A verificação da compatibilidade e adaptabilidade entre as cepas selecionadas e os referidos veículos é fundamental. Esses pré-

requisitos representam desafios tecnológicos significativos, uma vez que muitas bactérias probióticas são sensíveis à exposição a oxigênio, calor e ácidos. Diversos produtos lácteos probióticos, principalmente fermentados, e alguns não-lácteos, vêm sendo desenvolvidos (KOMATSU et al., 2008).

4.6 COMPRIMIDOS

Comprimidos são preparações farmacêuticas de consistência sólida, forma variada, geralmente cilíndrica ou lenticular, obtidas agregando-se, por meio de pressão, várias substâncias secas e podendo ou não encontrar-se envolvidos por revestimentos especiais, tomando, nesse caso, a designação, de comprimidos revestidos.

Possui relevância pelas inúmeras vantagens que apresenta – precisão na dosagem; conservação geralmente ilimitada ou pelo menos muito melhor do que a apresentada pelas soluções; rapidez na preparação; economia atendendo à facilidade de produção e rendimento; boa apresentação e reduzido volume. Além disso, apresenta múltiplas aplicações como finalidade terapêutica, analítica e depuradora de águas (PRISTA et al., 2002).

A compressão direta é o processo de escolha da indústria farmacêutica para produzir comprimidos. Para tal, é preciso submeter o produto, convenientemente preparado, a uma pressão exercida entre dois punções no interior de uma câmara de compressão ou matriz, cujo fundo é constituído pelo punção inferior. Simplicidade, redução de custos, rapidez, maior rendimento, não exposição do fármaco ao calor e aos solventes são vantagens oferecidas na produção de sólidos orais. Porém, o processo requer a utilização de excipientes com características específicas de compatibilidade físico-química, compactabilidade, fluidez, lubricidade e habilidade de proporcionar misturas uniformes (PRISTA et al., 2002; TOLLER; SCHMIDT, 2005).

Além da compressão direta, existem outras técnicas como granulação por via úmida e granulação a seco, cada um com suas próprias características, sendo a compressão direta o processamento mais rápido e prático.

Al-Mohizea et al. (2007) estudaram a produção de um comprimido de leveduras, utilizando a compressão direta e granulação a seco, em comparação a granulação úmida. Verificaram que a compressão direta foi a melhor técnica na produção desse comprimido, quanto as propriedades físicas testadas, principalmente quanto ao tempo de desintegração.

Embora simples em termos de processos unitários envolvidos, a compressão direta é altamente influenciada pelas características de escoamento, fluidez, compressibilidade e potencial de diluição dos adjuvantes farmacotécnicos utilizados. Comprimidos são constituídos por princípios ativos e excipientes, dos quais, nenhum possui todas as características físico-químicas apropriadas para o desenvolvimento de um processo de compressão. Muitas formulações (70-80 %) contêm excipientes em concentrações superiores as do ativo, conseqüentemente, os excipientes devem contribuir, significativamente, para a funcionalidade e processamento da formulação (NACHAEGARI; BANSAL, 2004).

Apesar dos comprimidos representarem uma forma farmacêutica bastante estável, alguns comprimidos podem sofrer alterações, por influência de fatores como: ar, umidade, escolha de excipientes e materiais de acondicionamento. A oxidação, geralmente, é acompanhada pela alteração da cor dos comprimidos, devido a reações de excipientes incompatíveis e, a solução deste problema, muitas vezes se faz por adição de catalisadores negativos (antioxidante). Para evitar a hidrólise, é comum o revestimento do granulado e quando há perda de constituintes voláteis, recorre-se a utilização de absorventes e a secagem deve se proceder à baixa temperatura e depois de prontos, acondicionados em lugar fresco e em embalagens impermeáveis (BRANDÃO, 2001).

Em comprimidos efervescentes, a efervescência é promovida pela libertação de gás (oxigênio ou anidrido carbônico) a partir de um peróxido ou a partir da junção de um ácido, como o cítrico, tartárico, ascórbico, algínico, etc, com um bicarbonato. Este último tipo de efervescência torna os comprimidos mais agradáveis e melhora a absorção, dado que o gás carbônico estabiliza a mucosa gástrica (PRISTA et al., 2002).

Klayraung et al. (2009) investigaram o efeito da sobrevivência de *Lactobacillus fermentum* em comprimidos com relação a força de compressão, utilizando excipientes formadores de matriz, como ftalato de hidroxipropil

metilcelulose (HPMCP) ou outros agentes de intumescimento. Observaram que a proporção de excipientes formadores de matriz e a força de compressão afetam as propriedades de comprimidos probióticos em termos de resistência à tração e desintegração assim como a sobrevivência da bactéria. Comprimidos manufacturados com alta força de compressão mostraram baixo tempo de desintegração e alta viabilidade celular. A estabilidade ao armazenamento dos comprimidos foi considerada boa quando estocados a 10 °C por seis meses.

4.7 EXCIPIENTES

Para se realizar a compressão da maioria das substâncias para obter o comprimido, é necessária a presença de excipientes. Estes são substâncias diferentes do princípio ativo, que tem por fim diluir o produto, aglutinar as suas partículas, facilitar a desagregação do comprimido, evitar a aderência do pó às punções e à matriz, podem auxiliar no processamento do sistema durante a fabricação, proteger ou melhorar a estabilidade, biodisponibilidade ou aceitação, ajudar na identificação do produto, melhorar qualquer outro atributo de segurança e efetividade do princípio ativo durante armazenamento ou uso (MORETON, 1995; PRISTA et al., 2002).

A origem dos excipientes pode ser animal – lactose, gelatina, ácido esteárico; vegetal – amidos, açúcares, celulose; mineral – fosfato de cálcio e sílica e sintética – polietilenoglicol, polisorbatos, povidona. Os excipientes existentes em qualquer fórmula de comprimidos podem ser divididos essencialmente em dois grandes grupos. Os excipientes tecnológicos compreendem os compostos que são adicionados à substância ativa porque se pretende veiculá-la na forma de comprimido e destinam-se a conferir ao produto a comprimir as características adequadas de compressibilidade ou a facilitar a cedência do fármaco. A sua inclusão é praticamente obrigatória em quase todas as fórmulas, como é o caso dos diluentes (inertes, adicionados aos pós a comprimir com a finalidade de originarem comprimidos de peso convenientes), lubrificantes (asseguram um completo enchimento da matriz e evitam a aderência dos pós aos cunhos da máquina, durante

compressão), aglutinantes (asseguram compressibilidade) e desagregantes (para acelerar a dissolução) (PIFFERI; RESTANI, 2002; PRISTA et al., 2002).

Os outros excipientes cuja adição é facultativa e que são adicionados quer devido à natureza específica do fármaco ou para melhorar suas características sensoriais, como os absorventes (adicionados com a finalidade de absorver água dos extratos ou de fixar certos compostos voláteis), os molhantes (diminuem a tensão interfacial pó e ar, favorecendo a dissolução) ou os tampões (mantém estável o pH de uma fórmula), os aromatizantes (essências), edulcorantes (corrigir o gosto de uma dada preparação) e corantes (torna o comprimido mais atrativo) (PRISTA et al., 2002; AULTON, 2005).

As características físico- químicas dos excipientes influenciam no comportamento de compactação dos sistemas sólidos particulados, uma vez que estes se apresentam, geralmente, em proporções maiores que o próprio fármaco, na formulação do comprimido. Cury et al. (2008) avaliaram a influência do tamanho dos granulados de celulose nas características físicas de comprimidos obtidos em diferentes diâmetros de punção e observaram que a redução do tamanho dos granulados levou à obtenção de compactos com resistência mecânica adequada e rápida desintegração, além de permitir a produção dos comprimidos sem a utilização de forças que representem o limite máximo do equipamento.

Os excipientes farmacêuticos podem ser responsáveis por inúmeras Reações Adversas a Medicamentos (RAM). Entre as formulações farmacêuticas mais consumidas no Brasil, principalmente as de uso pediátrico e de venda livre, foram detectados como possíveis causadores de RAM: metilparabeno, propilparabeno, corante amarelo tartrazina, bissulfito de sódio, benzoato de sódio, lactose, cloreto de benzalcônio, sorbitol e álcool benzílico. Assim, além de ter que garantir a dosagem, estabilidade e biodisponibilidade do princípio ativo, os componentes utilizados como excipientes, devem apresentar características com função tecnológica, e ser seguro. Há necessidade de maior atenção por parte dos profissionais de saúde, dos usuários de medicamentos e da avaliação pelos sistemas de farmacovigilância, da presença de excipientes como possíveis indutores de RAM (PIFFERI; RESTANI, 2003; SILVA et al., 2008).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 INFRA - ESTRUTURA

O trabalho foi desenvolvido no laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (Centro de Ciências Agrárias) e no Laboratório de Medicamentos da Universidade Estadual de Londrina.

5.2 MICRORGANISMOS

A bactéria láctica utilizada foi *Lactobacillus acidophilus* La-5 liofilizada, cedida gentilmente pela Christian Hansen (Dinamarca).

Já a levedura foi *Saccharomyces boulardii* isolada a partir do produto comercial Floratil® (Merck).

5.3 EXCIPIENTES

Foram utilizados para a formulação do comprimido efervescente probiótico (excipientes grau farmacêutico):

- Ácido cítrico anidro;
- Ácido tartárico;
- Amarelo crepúsculo;
- Amido de milho;
- Aroma de laranja;
- Bicarbonato de sódio;
- Estearato de magnésio [CH₃(CH₂)₁₆COO] 2Mg;

- Polivinilpirrolidona (PVP);
- Sacarose;
- Stevia;
- Soro de leite;
- Talco [Mg₆(Si₂O₅)₄(OH)₄]USP.

5.4 PRODUÇÃO DE MICRORGANISMOS EM PÓ

Para obtenção dos microrganismos probióticos em pó, utilizou-se a desidratação por liofilização e por estufa com circulação de ar.

5.4.1 Ativação, Obtenção da Biomassa e Produção de *L. Acidophilus* em Pó

A cultura mãe, de *L. acidophilus* liofilizada, foi reativada em 10 mL de solução estéril (110 °C/5 min) de leite em pó desnatado (Molico) 10 % adicionado de 1% de sacarose, e incubada a 37 °C por 18-24 h (PEREIRA; GÓMEZ,2007). Adicionou-se 90 mL de solução estéril de leite em pó desnatado 10 % à cultura assim produzida. Após ser incubada nas mesmas condições iniciais, adicionou-se 900 mL de solução estéril de leite em pó desnatado 10 % aos 100 mL da cultura obtida, permanecendo em incubação a 37 °C por 18-24 h. Posteriormente, uma parte desse cultivo foi centrifugada (Centrifuga Eppendorf) a 12.850 x g/10 min/ 4 °C, para assim obter biomassa úmida. Esta foi congelada com adição ou não de: leite desnatado 10 %, glicerol ou tampão fosfato 0,2 M (pH=7,2) para posteriormente ser liofilizada (liofilizador Perroni LS300). Obteve-se assim: *Lactobacillus acidophilus* sem protetor (La-1), *L. acidophilus* com leite em pó desnatado (La-2), *L. acidophilus* com glicerol (La-3) e *L. acidophilus* com glicerol e tampão fosfato 0,2 M ,pH=7,2 (La-4).

No cultivo obtido após fermentação e sem centrifugação, em uma parte adicionou-se carbonato de cálcio na relação 1:1 e na outra, amido de milho na mesma proporção. A secagem destas amostras foi conduzida em estufa com

circulação de ar a 40 °C (Nova Ética) até massa constante (12 a 14 h), obtendo-se assim: *L. acidophilus* com carbonato de cálcio (La-5) e *L. acidophilus* com amido de milho (La-6).

As amostras obtidas La-1 a La-6 foram armazenadas por dois meses a 5 °C para verificar a estabilidade, conforme item 5.5. Os diferentes tratamentos podem ser visualizados na figura 2.

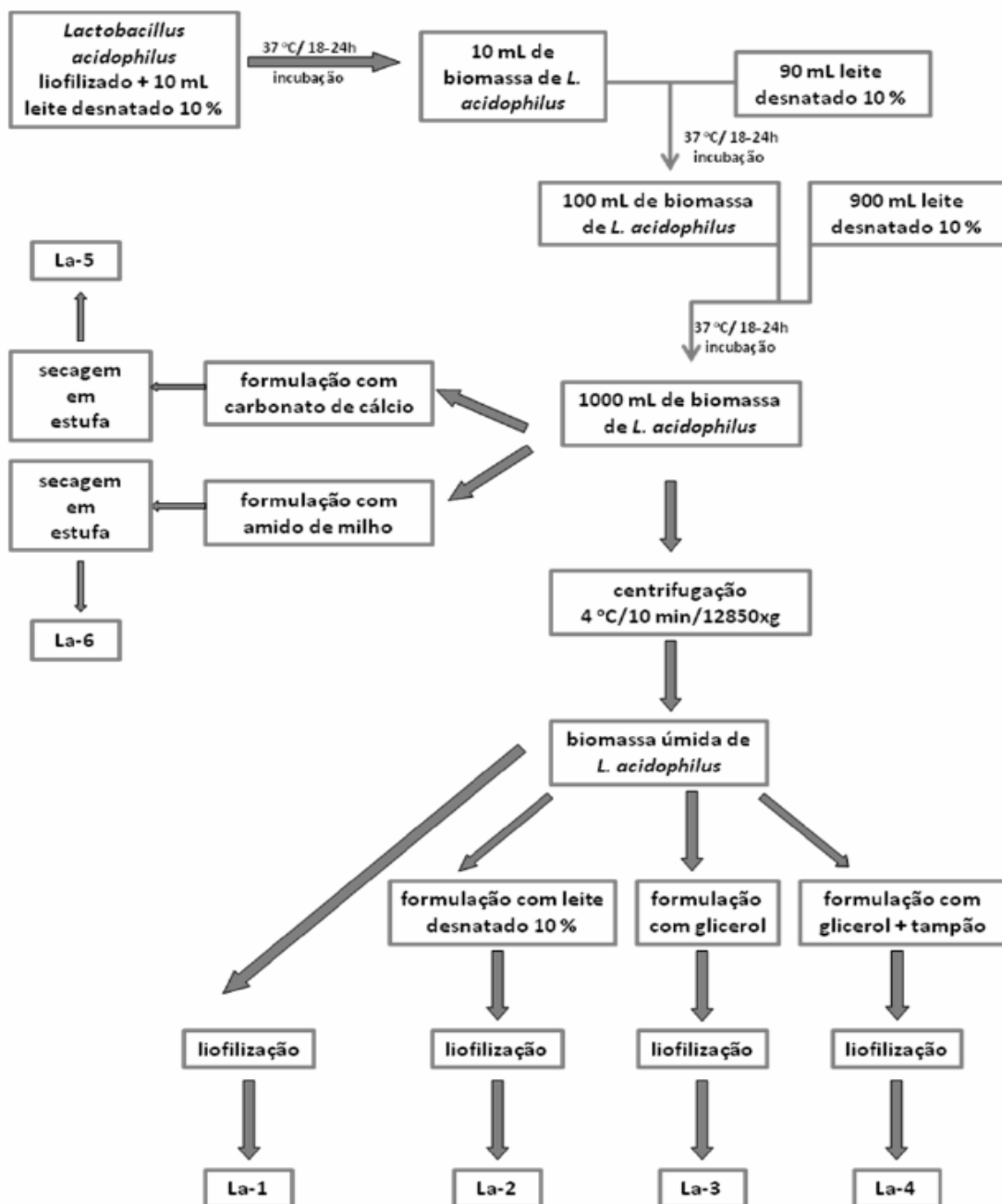


Figura 2 – Esquema de obtenção de *L. acidophilus* em pó.

5.4.2 Ativação, Obtenção da Biomassa e Produção de *Saccharomyces Boulardii* em Pó

A biomassa de *S. boulardii* foi obtida adicionando assepticamente 100 mg do Floratil® em 100 mL de meio YPD (Yeast, Peptone, Dextrose) esterilizado e incubado a 30 °C, por 12 h, sob agitação de 200 rpm em incubadora shaker refrigerada (Marconi MA 830/A) (MULLER, 2007). Em seguida a este cultivo adicionou-se 900 mL de YPD estéril incubado a 30 °C, por 20 h, sob agitação de 150 rpm (Tecnal TE- 421). Posteriormente, uma parte foi centrifugada (3.500 x g/ 10 min./ 10°C), obtendo-se uma biomassa úmida sendo liofilizada (liofilizador Perroni LS300): sem aditivos (Sb-1), com adição de solução de leite desnatado 10 % (Sb-2), com adição de glicerol (Sb-3) e com adição de glicerol e tampão fosfato 0,2 M, pH=7,2 (Sb-4).

A uma parte do caldo de cultivo obtido após fermentação e sem centrifugação, adicionou-se carbonato de cálcio na relação 1:1 e na outra, amido de milho na mesma proporção. A secagem destas amostras foi conduzida em estufa com circulação de ar a 40°C (Nova Ética) até massa constante (12 a 14 h), obtendo-se assim: *Saccharomyces boulardii* com carbonato de cálcio (Sb-5) e *S. boulardii* com amido de milho (Sb-6). Essa produção pode ser visualizada na figura 3.

As amostras obtidas Sb-1 a Sb-6 foram armazenadas por dois meses a 5 °C para verificar a estabilidade, conforme item 5.5.

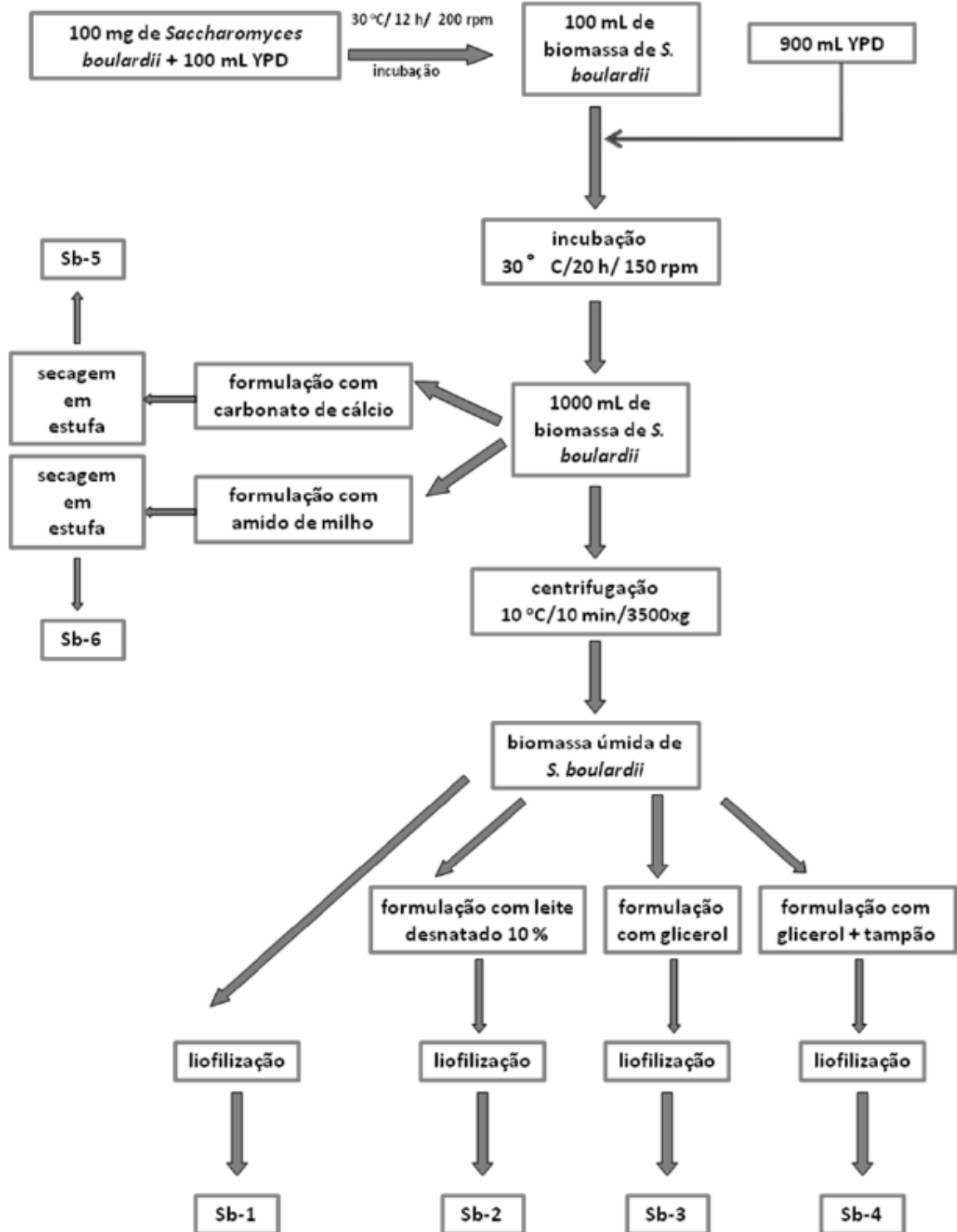


Figura 3 – Esquema de obtenção de *S. boulardii* em pó.

5.5 CONTAGEM DE BACTÉRIA LÁCTICA E LEVEDURA

Para a contagem de bactéria láctica e levedura, aplicou-se a técnica de semeadura em profundidade (método de “pour plate”) utilizando-se, respectivamente, MRS (Man, Rogosa e Sharp) Agar e BDA (Agar Batata Dextrose) estéreis, inoculando assepticamente as placas, em triplicata, a partir de diluições seriadas adequadas das amostras em água peptonada 0,1 % estéril. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C para *Lactobacillus acidophilus* e a 25 °C para *Saccharomyces boulardii*, durante 72 h. A obtenção UFC foi dada pela equação abaixo:

UFC/mL ou UFC/g = N x F, onde N é o número de colônias e F o fator de diluição.

5.6 DESENVOLVIMENTO DOS PRODUTOS PROBIÓTICOS EFERVESCENTES EM PÓ

A fim de disponibilizar mais opções de produtos probióticos no mercado, propôs-se desenvolver comprimidos, pós e ingredientes, todos efervescentes com probióticos, para serem adicionados a água (comprimido ou pó) e a refrescos em pó ou líquidos (ingrediente), facilitando assim a ingestão diária de microrganismos probióticos.

Os microrganismos probióticos em pó sugeridos, também podem ser produzidos industrialmente por empresas de biotecnologia existentes e na eventualidade dos produtos que estão sendo proposto venham a ser implementados industrialmente, a indústria poderá optar por produzi-los ou adquiri-los de outras empresas.

5.6.1 Comprimido e Pó Efervescentes Probióticos

Para a definição da composição do comprimido e pó efervescentes probióticos, realizou-se a avaliação dos efeitos dos componentes sobre a viabilidade

dos microrganismos por meio de experimentos baseados no planejamento fatorial 2^n , onde n corresponde ao número de variáveis. Foi utilizado o planejamento fatorial fracionado $2^{(9-5)}$, resolução III, num total de 16 experimentos, tendo a viabilidade dos probióticos como resposta. Para obtê-la, cada uma dessas 16 formulações foi adicionada a 9,0 mL de caldo nutriente estéril, inoculada assepticamente com *L. acidophilus* e *S. boulardii* para em seguida ser incubadas durante 24 h a 30 °C quando foi verificada a concentração (UFC/g) dos microrganismos probióticos utilizando a metodologia descrita no item 5.6.1.1.

A Tabela 2 indica os níveis de variação dos ingredientes utilizados no desenho experimental $2^{(9-5)}$ e na Tabela 3 as formulações codificadas para avaliação dos efeitos dos componentes sobre a viabilidade dos microrganismos probióticos.

A partir dos resultados obtidos nos testes para verificação da influência dos excipientes, obteve-se a melhor formulação do comprimido, sendo este preparado pela mistura dos ingredientes e os comprimidos obtidos a partir de uma compressora rotativa (marca Neuberger 16 punções, modelo MN2).

Tabela 2 – Ingredientes e níveis utilizados no desenho experimental $2^{(9-5)}$

Ingredientes	Níveis	
	-1	+1
Ácido tartárico	5,0 %	20,0 %
Ácido cítrico	5,0 %	20,0 %
Bicarbonato de Na	5,0 %	20,0 %
PVP	5,0 %	15,0 %
Aroma	0,2 %	2,0 %
Stevia	0,2 %	2,0 %
Sacarose	0,2 %	2,0 %
Soro	5,0 %	15,0 %
Manitol corado	4,0 %	40,0 %

5.6.1.1 Viabilidade dos microrganismos

Uma quantidade de 700 mg do pó ou comprimido foi adicionado a 6,3 mL de água peptonada e após 2 minutos, recolheu-se uma alíquota de 1 mL para diluição seriada para plaqueamento em MRS ágar adicionado do antifúngico Cetoconazol (no Anexo, figuras 7, 8 e 9), a fim de se contar o número de unidades formadoras de colônia de *Lactobacillus acidophilus* após crescimento em estufa a 37 °C por 72 h. Também retirou-se uma alíquota para contagem da levedura em BDA (Agar batata dextrose), em estufa durante 72 h, não sendo necessária a utilização de um antibiótico, uma vez que *L. acidophilus* não se desenvolveu nessas condições (no Anexo, figura 6).

5.6.1.2 Propriedades físicas dos comprimidos

Para determinar as propriedades físicas dos comprimidos obtidos, foram realizados os seguintes testes:

5.6.1.2.1 Peso médio

Pesaram-se, individual e aleatoriamente, 10 comprimidos, em balança analítica (Mettler AE-200) e determinou-se a média dos mesmos, considerando-se um desvio de $\pm 5\%$ em relação ao peso médio (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

5.6.1.2.2 Dureza

Determinou-se por meio da resistência ao esmagamento ou à

ruptura sob pressão contínua medida com auxílio de um durômetro (Erweka TBH-30) e o resultado obtido pela média aritmética da resistência de 10 comprimidos expresso em Newton (N) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Recomenda-se valor de dureza mínima de 30 N.

5.6.1.2.3 Friabilidade

Determinou-se a resistência dos comprimidos a choque e atrito em friabilômetro (Erweka TAR). Amostras de 10 comprimidos foram submetidos a 25 rpm por quatro minutos. É aceitável o valor máximo de 1 % de perda de peso dos comprimidos pesados (FARMACOPÉIA AMERICANA, 32 ed.).

5.6.1.2.4 Desintegração

Determinou-se o tempo de desintegração de seis comprimidos em aparelho de desintegração (Erweka ZT3) e utilizando-se água destilada a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ como meio de desintegração (Farmacopéia Americana, 32 ed.). Para comprimidos efervescentes se aceita como tempo limite de desintegração de cinco minutos.

5.6.1.2.5 Estabilidade no armazenamento

Os comprimidos e o produto em pó foram armazenados por dois meses a 25°C , com análises periódicas da viabilidade dos microrganismos de acordo com o item 5.6.1.1.

5.6.1.3 Efeito da força de compressão na viabilidade dos probióticos

Por meio de forças de compressão distintas, produziram-se comprimidos com diferentes durezas: 20 N, 40 N e 60 N. Realizou-se a contagem dos microrganismos, conforme item 5.6.1.1, a fim de verificar a relação entre dureza e viabilidade.

5.6.1.4 Efeito do trato gastrointestinal na viabilidade dos probióticos

Adicionou-se 1,0 g de produto em 9,0 mL de suco gástrico simulado esterilizado (0,08 M HCl contendo 0,2 % de NaCl em pH 2,0), permanecendo em contato por duas horas a 37 °C . Após incubação, 1,0 mL da amostra foi retirado nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos para determinação da viabilidade dos microrganismos e outro 1,0 mL, nesses mesmos tempos, adicionado a 9,0 mL de suco intestinal simulado estéril (0,05 M K₂PO₄ em pH 6,8 adicionado de 0,6 % de sais biliares) incubados a 37 °C por 150 minutos. Passado esse tempo, 1,0 mL foi utilizado para verificar a viabilidade dos microrganismos probióticos (RAO et al., 1989; THANTSHA et al., 2008 modificados).

5.7 DESENVOLVIMENTO DE INGREDIENTE EM PÓ EFERVESCENTE PROBIÓTICO

Produziu-se uma formulação para desenvolvimento de um ingrediente efervescente probiótico em pó para ser adicionado a outros produtos, como por exemplo, refresco em pó ou líquidos. Foi utilizado um ácido orgânico juntamente com bicarbonato de sódio como componentes para produzir efervescência. A quantidade de microrganismo probiótico foi determinada considerando a concentração destes microrganismos obtidos por desidratação para atingir 10⁴ UFC/mL de refresco líquido.

Foram preparados dois refrescos em pó comerciais, sendo um

normal (A) e outro dietético (B) aos quais foi adicionado o ingrediente efervescente probiótico, armazenado durante 48 h a 5 °C para verificar a viabilidade dos microrganismos nos seguintes tempos: 0 h; 0,75 h; 3 h; 7 h; 12 h; 24 h e 48 h.. Esta foi determinada conforme descrito no item 5.6.1.1.

5.7.1 Estabilidade do Ingrediente em pó Efervescente Probiótico

Ingredientes do refresco em pó comercial A (normal): açúcar, edulcorantes artificiais (aspartame, ciclamato de sódio, acesulfame de potássio e sacarina sódica), polpa de laranja desidratada, acidulante ácido cítrico, citrato de potássio, antiemético fosfato tricálcico, corante inorgânico dióxido de titânio, espessantes carboximetilcelulose e goma xantana e corantes artificiais (amarelo crepúsculo e tartrazina), aromatizante, ferro, vitamina C, vitamina A.

Ingredientes do refresco em pó comercial B (dietético): edulcorantes artificiais (ciclamato de sódio, aspartame e sacarina sódica), maltodextrina, polpa de laranja, acidulante ácido cítrico, citrato de sódio, antiemético fosfato tricálcico, corante inorgânico dióxido de titânio, corantes artificiais (amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo), espessantes (carboximetilcelulose e goma xantana), aroma idêntico ao natural de laranja, antioxidante ácido ascórbico.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A viabilidade dos microrganismos foi avaliada pela análise de variância ANOVA para detectar diferenças significativas e as médias, obtidas a partir de contagens em triplicata, comparadas pelo teste de Tukey com nível de 5 % de significância, programa estatística SAS- Agri (CANTERI et al., 2001).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 PRODUÇÃO E ESTABILIDADE DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS NO ARMAZENAMENTO

O cultivo de *L. acidophilus* apresentou contagem de $9,0 \times 10^8$ UFC/mL e sua biomassa (obtida pela centrifugação), de $1,91 \times 10^{10}$ UFC/g. Para a levedura, a contagem do cultivo foi de $2,4 \times 10^8$ UFC/mL e da biomassa de $1,4 \times 10^{10}$ UFC/g.

Nas tabelas 4, 6 e 8, são apresentados os valores de concentração (log UFC/g) de *Lactobacillus acidophilus* e *Saccharomyces boulardii* desidratados por liofilização e por secagem em estufa, armazenados durante dois meses em ambiente controlado a 5°C e 60% UR. As tabelas 5 e 7 indicam as perdas de viabilidade dos probióticos (log UFC/g) durante o armazenamento.

Verifica-se nestas tabelas, que durante o armazenamento de dois meses, ocorreu a queda da viabilidade para ambos os microrganismos, com média de 2,19 ciclos logarítmicos para *Lactobacillus acidophilus* e de 0,50 ciclo logarítmico para *Saccharomyces boulardii*, indicando uma maior estabilidade da levedura quando comparada à bactéria.

Zárate e Nader-Macias (2006) também obtiveram queda na viabilidade de *L. acidophilus* CRL 1259, *L. paracasei* CRL 1289 e *L. salivarius* CRL 1328 imediatamente após processo de liofilização, com valores de 0,05 a 2 ciclos logarítmicos.

Como se pode observar a liofilização da biomassa do *Lactobacillus acidophilus* adicionada de leite desnatado (La-2) foi a que apresentou maior estabilidade no armazenamento seguida do tratamento La-3. O mais afetado foi o tratamento La-4, com glicerol e tampão (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 – Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* liofilizado, armazenados aos zero, 15, 30, 45 e 60 dias, a 5 °C e 60% de umidade relativa.

Tratamentos	Tempo de Armazenamento (dias)				
	0	15	30	45	60
La-1	9.14	7.42	6.67	5.83	5.71
La-2	8.09	7.21	8.16	6.81	6.72
La-3	8.11	7.25	7.04	5.63	6.15
La-4	9.56	6.57	6.94	5.63	6.11

La-1: *Lactobacillus acidophilus* ; La-2: *L.acidophilus* + leite; La-3: *L.acidophilus* + Glicerol; La-4: *L.acidophilus* + glicerol + tampão

Tabela 5 – Perda de viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* durante armazenamento a 5°C por um período de 60 dias.

	log 0 dias – log 15 dias	log 15 dias – log 30 dias	log 30dias – log 45 dias	log 45 dias – log 60 dias	log 0 dias – log 60 dias
La-1	1,65	0,75	0,84	0,12	3,43
La-2	0,88	-0,95	1,35	0,09	1,37
La-3	0,83	0,21	1,41	-0,52	1,96
La-4	2,99	-0,37	1,31	-0,48	3,45

La-1: *Lactobacillus acidophilus* ; La-2: *L.acidophilus* + leite; La-3: *L.acidophilus* + Glicerol; La-4: *L.acidophilus* + glicerol + tampão

No caso da liofilização da biomassa da *Saccharomyces boulardii* o tratamento na presença de glicerol e tampão (Sb-4) foi o tratamento que apresentou maior estabilidade durante o período de 60 dias de armazenamento, sendo seguida pelo tratamento Sb-3 que utilizou apenas o glicerol. O tratamento Sb-1 foi o que apresentou menor estabilidade (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6 – Viabilidade de *Saccharomyces boulardii* liofilizado, armazenados a 5°C e 60% UR.

Tratamentos	Tempo de Armazenamento (dias)				
	0	15	30	45	60
Sb-1	9.21	9.29	8.52	8.78	8.25
Sb-2	9.63	9.37	9.11	9.31	8.71
Sb-3	9.04	9.94	8.87	8.81	8.42
Sb-4	9.28	9.51	8.96	9.16	9.11

Sb-1: *Saccharomyces boulardii* ; Sb-2: *S.boulardii*+ leite; Sb-3: *S.boulardii* + Glicerol; Sb-4: *S.boulardii* + glicerol + tampão

Tabela 7 – Perda de viabilidade do *Saccharomyces boulardii* durante armazenamento a 5°C durante 60 dias.

Tratamento	log 0 dias – log 15 dias	log 15 dias – log 30 dias	log 30 dias – log 45 dias	log 45 dias – log 60 dias	log 0 dias - log 60 dias
Sb-1	-0,08	0,77	-0,26	-0,26	0,96
Sb-2	0,26	0,26	-0,20	0,60	0,92
Sb-3	0,90	1,07	0,06	0,39	0,62
Sb-4	-0,23	0,55	-0,20	0,05	0,17

Sb-1: *Saccharomyces boulardii* ; Sb-2: *S.boulardii*+ leite; Sb-3: *S.boulardii* s + Glicerol; Sb-4: *S.boulardii* + glicerol + tampão.

Além do processo de liofilização, utilizou-se desidratação em estufa por ser um processo viavelmente mais econômico, uma vez que não utiliza equipamentos como centrífuga e liofilizador, além de ser um procedimento tecnologicamente mais simples e produtivo. No entanto, o produto obtido apresenta menor concentração de microrganismo probiótico (Tabela 8) quando comparada às amostras obtidas por liofilização (Tabelas 4 e 6), uma vez que no preparo desses produtos não se procedeu a centrifugação do cultivo.

Tabela 8 – Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Saccharomyces boulardii* desidratados em estufa a 40°C, armazenados a 5°C e 60% de umidade relativa.

Tratamentos	Tempo de Armazenamento (dias)				
	0	15	30	45	60
La-5	7.61	4.23	4.83	3.99	4.93
La-6	5.45	4.89	6.94	5.31	5.16
Sb-5	7.31	7.28	7.17	7.27	7.41
Sb-6	7.31	7.25	7.15	7.01	6.91

La-5 :*Lactobacillus acidophilus* + CaCO₃ ; La-6: *L.acidophilus* + amido de milho; Sb-5: *Saccharomyces boulardii* + CaCO₃ ; Sb-6: *S.boulardii*+ amido de milho

Tabela 9 – Perda de viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Saccharomyces boulardii* durante armazenamento a 5 °C durante 60 dias.

Tratamento	log 0 dias –	log 15 dias –	log 30 dias –	log 45 dias –	log 0 dias -
	log 15 dias	log 30 dias	log 45 dias	log 60 dias	log 60 dias
La-5	3,38	-0,6	0,84	-0,94	2,68
La-6	0,56	-2,05	1,63	0,15	0,29
Sb-5	0,03	0,11	-0,10	-0,14	-0,10
Sb-6	0,06	0,10	0,13	0,10	0,40

La-5 :*Lactobacillus acidophilus* + CaCO₃ ; La-6: *L.acidophilus* + amido de milho; Sb-5: *Saccharomyces boulardii* + CaCO₃ ; Sb-6: *S.boulardii* + amido de milho

Assim, observa-se na tabela 9 acima, que durante o armazenamento na presença de amido de milho (La-6), o *Lactobacillus acidophilus* obteve uma menor perda em sua concentração, o que pode indicar a importância do amido de milho na estabilidade da bactéria nesse período. Já para o caso da levedura, o tratamento com carbonato de cálcio (Sb-5) apresentou estabilidade levemente superior à do amido de milho (Sb-6).

De acordo com os resultados acima descritos, pode-se verificar que em ambos os processos ocorrem perdas de viabilidade (sobrevivência) dos probióticos em função, provavelmente, das tecnologias de secagem às quais foram submetidas, que segundo alguns pesquisadores podem trazer como consequência danos celular, seja na parede, membrana (oxidação lipídica) e no próprio DNA, além

de desnaturação protéica. A sobrevivência dos microrganismos submetidos a processos de secagem e/ou armazenamento depende de vários fatores que interagem entre si, tais como a espécie, sua concentração inicial, composição do substrato, condições de cultivo, tecnologias de conservação, reidratação de cepas, entre outros (TEIXEIRA et al., 1995; CARVALHO et al., 2004).

Pode-se verificar por meio das tabelas 5 e 7, que a queda mais acentuada de viabilidade, da maioria dos tratamentos, ocorreu durante os 15 primeiros dias de armazenagem, provavelmente porque nesta fase alguns microrganismos não conseguem se adaptar às novas condições. Observa-se também que, após os dois meses de armazenamento, a maior queda de concentração (total de perda de ciclos logaritmicos), tanto para *L. acidophilus* como para *S. boulardii*, foi para as amostras liofilizadas e sem um veículo, sendo de 3,36 e 0,96, respectivamente. Isto indica a importância do uso de protetores no processo de liofilização de microrganismos, uma vez que neste processo, as células passam por condições extremas, como congelamento e baixa atividade de água, produzindo injúria estrutural e fisiológica, que trazem como consequência uma queda na viabilidade.

Pela análise estatística dos resultados na tabela 10, da viabilidade de *L. acidophilus* após 60 dias de armazenamento, observa-se que o melhor tratamento significativo para a bactéria foi o La-2, *Lactobacillus acidophilus* adicionado de leite desnatado 10 % obtido por liofilização, seguidos de La-3 e La-4 que não apresentaram significância entre eles. Já para a perda de viabilidade (log 0 dia – log 60 dias), o La-6 (adicionado de amido de milho) e o La-2, com leite desnatado 10 % foram os que obtiveram maior estabilidade após os 60 dias de armazenamento.

Tabela 10 – Viabilidade e perda de viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* após 60 dias de armazenamento a 5°C e 60% UR.

Tratamento	log (UFC/g) 0 dias	log (UFC/g) 60 dias	log 0 dias - log 60 dias
La-1	9,133 a	5,703 c	3,430 a
La-2	8,090 b	6,717 a	1,373 d
La-3	8,110 b	6,150 b	1,960 c
La-4	9,563 a	6,107 b	3,456 a
La-5	7,607 c	4,933 d	2,673 b
La-6	5,456 d	5,157 d	0,300 d
C.V. (%)	2,12	2,09	11,00

Letras iguais nas colunas não diferem pelo teste de Tukey em nível de 5 % de probabilidade.

La-1: *L.acidophilus* ; La-2: *L.acidophilus* + leite; La-3: *L.acidophilus* + Glicerol;

La-4: *L.acidophilus* + glicerol + tampão; La-5 :*L. acidophilus* + CaCO₃ ;

La-6: *L.acidophilus* + amido de milho

La-1 a La-4: liofilizados; La-5 e La-6: desidratados em estufa

No caso da levedura (Tabela 11), foi *Saccharomyces boulardii* liofilizado com glicerol e tampão (Sb-4) o que obteve maior contagem no final do período de armazenamento de 60 dias, sendo seguido pelo Sb-2, em que a levedura foi liofilizada na presença de leite desnatado 10 %, e de Sb-3, liofilizado com glicerol. Em relação à perda de viabilidade, Sb-5 (adicionado de carbonato de cálcio) e Sb-4 (adicionado de glicerol e tampão) obtiveram maior estabilidade durante o período de armazenamento.

Tabela 11 – Viabilidade e perda de viabilidade de *Saccharomyces boulardii* após 60 dias de armazenamento a 5 °C e 60% UR.

Tratamento	log (UFC/g) 0 dias*	0 log (UFC/g) 60 dias**	log 0 dias - log 60 dias
Sb-1	9,203 bc	8,253 c	0,960 a
Sb-2	9,627 a	8,700 b	0,926 a
Sb-3	9,043 c	8,417 bc	0,626 ab
Sb-4	9,273 b	9,113 a	0,170 cd
Sb-5	7,303 d	7,397 d	-0,100 d
Sb-6	7,313 d	6,907 e	0,406 bc
C.V. (%)	0,81	1,62	31,11

Sb-1: *S. boulardii* ; Sb-2: *S. boulardii*+ leite;
 Sb-3: *S. boulardii* s + Glicerol; Sb-4: *S. boulardii* + glicerol + tampão ;
 Sb-5: *S. boulardii* + CaCO₃ ; Sb-6: *S. boulardii* + amido de milho
 Sb-1 a Sb-4: liofilizados; Sb-5 e Sb-6: desidratados em estufa

De acordo com os resultados apresentados, verifica-se que o leite desnatado mostrou-se um importante veículo protetor para a obtenção de uma boa viabilidade, tanto para *L. acidophilus* como para *S. boulardii* e, também, para a estabilidade durante armazenamento para *L. acidophilus* (Tabelas 10 e 11). Isso porque o leite desnatado contém grande quantidade de nutrientes, como 32 -35,7 % de proteínas e 48,4 – 54,1 % de lactose que, segundo alguns pesquisadores, podem evitar injúria celular pela estabilização dos constituintes da membrana celular, que cria uma estrutura porosa em produtos liofilizados, facilitando a posterior reidratação, além de conter proteínas que fornecem uma estrutura protetora às células (SELMER-OLSEN et al., 1999; ABADIAS et al., 2001; NANASOMBAT; SRIWONG, 2007).

Por outro lado, o glicerol é bioquimicamente compatível com estruturas celulares sendo frequentemente usado na conservação de cepas microbianas. É considerado, assim, como um agente crioprotetor, uma vez que impede a difusão da água no interior das células, não permitindo formação de cristais de gelo e o conseqüente rompimento celular, mantendo desta forma a

estabilidade da parede e vitalidade da mesma durante o processo de congelamento. Assim, as células podem ser preservadas por um tempo maior e recuperar suas funções normais quando forem devidamente descongeladas (TSURUTA et al., 1998; CAMPOS et al., 2004; ARRUDA et al., 2007).

Segundo Barreto et al. (2003), a maioria dos produtos comercializados no Brasil ainda não contém ou não declara a presença de cepas probióticas de maior interesse, como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* e bifidobactérias, predominando os leites fermentados produzidos com fermentos lácticos e *Lactobacillus* sp. Os produtos que declaram a presença de culturas puras de *L. casei* apresentam excelente condição de viabilidade das cepas, ao contrário dos que declaram a presença de *L. acidophilus* e bifidobactérias, encontradas em contagens abaixo de 10⁵ UFC/g. A perda de viabilidade desses microrganismos nos produtos fermentados parece não depender apenas do tempo de estocagem, mas também da própria sensibilidade das cepas às condições de processo. Portanto, para elevar a taxa de sobrevivência desses microrganismos serão necessárias inovações tecnológicas como seleção de cepas mais resistentes ao processo utilizado, microencapsulação, pré-adaptação às condições de estresse, adição de micronutrientes e agentes redutores.

Se o processo de congelamento for lento, haverá tempo para a água se dirigir às células por osmose. Assim, se estas não perderem água rapidamente para manter o equilíbrio interno, cristais de gelo eventualmente se formam, o que torna o uso de protetores importante, uma vez que reduzem a quantidade de ligação com a água na superfície das proteínas, formando ponte de hidrogênio com a proteína (BERNY; HENNEBERT, 1991; ABADIAS, 2001).

Dessa forma, no preparo da formulação do comprimido e do pó efervescente probiótico, a produção dos microrganismos foi por liofilização da biomassa das culturas dissolvidas em solução 10 % de leite desnatado, uma vez que esse tratamento foi o melhor para a bactéria láctica, tanto na viabilidade quanto estabilidade e, o segundo melhor para a levedura na obtenção de viabilidade. Uma vez que o pó obtido do tratamento para a levedura com glicerol e tampão, não foi um pó muito fino e se procurou utilizar a mesma metodologia de produção para ambos os microrganismos (Figuras 2 e 3).

6.2 DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS EFERVESCENTES PROBIÓTICOS

A tabela 12 abaixo apresenta os efeitos dos ingredientes da formulação do comprimido sobre a viabilidade dos microrganismos (*Lactobacillus acidophilus* e *Saccharomyces boulardii*) utilizando o planejamento fatorial $2^{(9-5)}$.

Tabela 12 – Efeito dos ingredientes(em g) utilizados na formulação do comprimido e do pó na viabilidade dos microrganismos probióticos (UFC).

	Ácido tartárico	Ácido cítrico	Bicarbonato de sódio	PVP	Aroma	Stevia	Sacarose	Soro	Manitol corado	<i>L. acidophilus</i>	<i>S. boulardii</i>
1	0,05	0,05	0,05	0,05	0,002	0,002	0,002	0,05	0,40	9,28	11,07
2	0,20	0,05	0,05	0,05	0,020	0,002	0,020	0,15	0,04	3,92	11,34
3	0,05	0,20	0,05	0,05	0,020	0,020	0,002	0,15	0,04	5,38	7,82
4	0,20	0,20	0,05	0,05	0,002	0,020	0,020	0,05	0,40	3,26	10,35
5	0,05	0,05	0,20	0,05	0,020	0,020	0,020	0,05	0,04	9,75	9,98
6	0,20	0,05	0,20	0,05	0,002	0,020	0,002	0,15	0,40	10,97	11,40
7	0,05	0,20	0,20	0,05	0,002	0,002	0,020	0,15	0,40	10,93	11,35
8	0,20	0,20	0,20	0,05	0,020	0,002	0,002	0,05	0,04	4,28	6,77
9	0,05	0,05	0,05	0,15	0,002	0,020	0,020	0,15	0,04	9,16	10,73
10	0,20	0,05	0,05	0,15	0,020	0,020	0,002	0,05	0,40	6,73	6,44
11	0,05	0,20	0,05	0,15	0,020	0,002	0,020	0,05	0,40	4,26	7,89
12	0,20	0,20	0,05	0,15	0,002	0,002	0,002	0,15	0,04	6,17	10,29
13	0,05	0,05	0,20	0,15	0,020	0,002	0,002	0,15	0,40	10,46	11,03
14	0,20	0,05	0,20	0,15	0,002	0,002	0,020	0,05	0,04	9,65	10,81
15	0,05	0,20	0,20	0,15	0,002	0,020	0,002	0,05	0,04	10,61	10,58
16	0,20	0,20	0,20	0,15	0,020	0,020	0,020	0,15	0,40	10,70	10,68

Na tabela 13, apresentam-se os resultados dos efeitos principais e sua significância.

Tabela 13 – Efeitos dos ingredientes da formulação no crescimento da *Saccharomyces boulardii*.

	Efeito	p
Mean/Interc.	9,90812	0,000000
Ácido tartárico (g)	- 0,29625	0,673704
Ácido cítrico (g)	-0,88375	0,235046
Bicarbonato de sódio (g)	0,83375	0,259533
PVP (g)	-0,20375	0,771204
Aroma (g)	-1,82875	0,034145
Stevia (g)	-0,32125	0,648407
Sacarose (g)	0,96625	0,199145
Soro (g)	1,34375	0,091579
Manitol corado (g)	0,23625	0,736304

Como se observa na tabela 13, os ingredientes que apresentaram efeitos negativos para o crescimento da levedura foram o ácido tartárico, ácido cítrico, a polivinilpirrolidona (PVP), o aroma natural idêntico ao de laranja e o adoçante “Stevia”. Destes, o único que foi significativo foi o aroma ($p=0,034145$). Estes resultados sugerem que os ingredientes que apresentaram efeitos negativos na viabilidade da levedura podem provocar uma queda na concentração do microrganismo após a preparação da bebida, que poderia ser menos prejudicial quando estes ingredientes estiverem presentes na formulação do pó na menor

concentração possível, tendo especial cuidado com a concentração do aroma. Cabe salientar, entretanto, que o produto está desenhado para ser consumido imediatamente após sua reidratação e não poderia ser guardado após sua preparação.

Tabela 14 – Efeitos dos ingredientes da formulação no crescimento do *Lactobacillus acidophilus*.

	Efeito	p
Mean/Interc.	7,84437	0,000001
Ácido tartárico (g)	-1,76875	0,052793
Ácido cítrico (g)	-1,79125	0,050639
Bicarbonato Na (g)	3,64875	0,002539
PVP (g)	1,24625	0,140831
Aroma (g)	-1,81875	0,048131
Stevia (g)	0,95125	0,243085
Sacarose (g)	-0,28125	0,715112
Soro (g)	1,23375	0,144176
Manitol corado (g)	0,95875	0,239806

Verifica-se na tabela 14, que a concentração do *Lactobacillus acidophilus* foi afetada negativamente pelo ácido tartárico, ácido cítrico, sacarose e pelo aroma, sendo este último o único no qual o efeito foi significativo ($p=0,048$). Os outros ingredientes, como o bicarbonato de sódio, o soro de leite, o adoçante “Stevia”, PVP e o manitol corado, apresentaram um efeito positivo, sendo que o único que foi significativo foi o bicarbonato. Um aumento de concentração destes

ingredientes na composição do comprimido ou na formulação de um produto em pó favoreceria a estabilidade desta bactéria no produto, sendo o teor de bicarbonato o mais influente neste sentido. Entretanto, como já foi mencionado anteriormente, o produto está proposto para ser consumido imediatamente após sua preparação.

6.2.1 Formulação do Pó e Comprimido Efervescentes Probióticos

Considerando os resultados dos efeitos dos ingredientes na viabilidade dos microrganismos probióticos, foi obtida a formulação do pó efervescente probiótico (Figura 4) indicada na tabela 15 e do comprimido efervescente probiótico (Figura 5) nas tabelas 16 e 17.

Tabela 15 – Formulação do pó efervescente probiótico (produzidos por liofilização em solução 10 % de leite desnatado).

Composição do pó	Quantidade (%g)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> *	10,0
<i>Saccharomyces boulardii</i> *	10,0
Ácido cítrico	15,0
Bicarbonato de sódio	15,0
Aroma de laranja	1,0
Stevia	1,0
Manitol corado**	48,0

*suficiente para atingir uma concentração de 106 UFC/g.

** 2,4 mL de solução de amarelo crepúsculo a 1% mais 3,6 mL de água em 30 g de manitol. Secagem em estufa com circulação de ar e triturado em moinho (Coffee grinder Model DCG-20).



Figura 4 – Pó efervescente probiótico.

Tabela 16 – Formulação laboratorial do comprimido efervescente probiótico (produzidos por liofilização em solução 10 % leite desnatado).

Composição comprimido	Quantidade (%g)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> *	10,0
<i>Saccharomyces boulardii</i> *	10,0
Ácido cítrico	15,0
Bicarbonato de sódio	15,0
PVP	9,3
Aroma de laranja	1,0
Stevia	1,0
Manitol corado**	38,7

* suficiente para atingir uma concentração de 10^7 UFC/comprimido.

** 2,4 mL de solução de amarelo crepúsculo à 1% mais 3,6 mL de água em 30 g de manitol. Secagem em estufa com circulação de ar e triturado em moinho.



Figura 5 – Comprimido efervescente probiótico na compressora.

Na formulação do pó e comprimido efervescente probiótico, conforme tabelas 5 e 6, respectivamente, utilizou-se os microrganismos produzidos por liofilização em solução 10 % de leite desnatado, como anteriormente justificado.

Além disso, realizou-se a produção do comprimido efervescente probiótico em maior escala - industrial, utilizando-se assim na sua formulação (Tabela 17), talco que é um agente antiagregante, ligante, diluente e lubrificante de cápsulas e comprimidos, além de estearato de magnésio, excipiente lubrificante e antiaderente nas formulações. Por ser uma formulação industrial, em que se utilizou uma grande quantidade de microrganismo em pó, optou-se por produzir os probióticos utilizando a desidratação em estufa com circulador de ar com amido de milho, uma vez que é um processo tecnologicamente mais viável na obtenção de grande quantidade de biomassa em pó, e como já mencionado, não há a necessidade de centrifugador e liofilizador.

Tabela 17 – Formulação Industrial do comprimido efervescente probiótico (produzidos por desidratação em estufa na presença de amido de milho.

Composição do comprimido	Quantidade (%g)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> *	10,0
<i>Saccharomyces boulardii</i> *	10,0
Ácido cítrico	15,0
Bicarbonato de sódio	15,0
PVP	9,3
Aroma de laranja	1,0
Stevia	1,0
Talco	2,0
Estearato de magnésio	0,6
Manitol corado**	36,1

*ou suficiente para atingir uma concentração de 107 UFC/comprimido).

** 2,4 mL de solução de amarelo crepúsculo à 1% mais 3,6 mL de água em 30 g de manitol. Secagem em estufa com circulação de ar e triturado em moinho.

6.2.2 Viabilidade dos Microrganismos nos Produtos Efervescentes Probióticos

Nas tabelas 18 e 19, observam-se resultados de viabilidade durante armazenamento a 25 °C, durante 60 dias, para *L. acidophilus* e *S. boulardii* no pó e comprimido probiótico efervescente, respectivamente. Na Tabela 20, apresentam-se os resultados da viabilidade dos microrganismos no pó probiótico efervescente elaborado com cepas liofilizadas comerciais.

Tabela 18 – Viabilidade de *L. acidophilus* e *S. boulardii* no pó efervescente probiótico, produzidos por liofilização com leite desnatado a 10 % em condições de laboratório e armazenados aos zero, 15, 30, 45 e 60 dias a 25°C.

Microrganismo Probiótico	Tempo de Armazenamento				
	0	15	30	45	60
<i>L. acidophilus</i>	5.15	5.08	6.11	5.48	4.92
<i>S. boulardii</i>	6.70	6.43	6.60	6.69	6.62

Tabela 19 – Viabilidade de *L. acidophilus* e *S. boulardii* no comprimido efervescente probiótico (produzidos por liofilização com leite desnatado 10 %) e armazenados a 25°C durante 60 dias.

Microrganismo Probiótico	Tempo de Armazenamento (dias)				
	0 dias	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
<i>L. acidophilus</i>	5.18	3.79	5.18	3.72	2.91
<i>S. boulardii</i>	5.30	4.18	3.67	3.85	2.99

Tabela 20 – Viabilidade de *L. acidophilus* e *S. boulardii* comerciais do pó efervescente probiótico, armazenados a 25°C durante 60 dias.

Microrganismo Probiótico (comercial)	Tempo de Armazenamento (dias)				
	0 dias	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
<i>L. acidophilus</i> *	11.08	10.28	8.78	8.08	8.04
<i>S. boulardii</i> *	9.96	9.26	9.40	9.78	9.99

*Cepas comerciais liofilizadas.

Observa-se que para o pó efervescente probiótico (tabela 18), ocorreu pequena queda da contagem durante o armazenamento (menos de 0,3 ciclos logarítmicos), para ambas as cepas. Já para o comprimido efervescente probiótico (tabela 19), houve queda mais expressiva na contagem dos probióticos (aproximadamente 2,3 ciclos logarítmicos) uma vez que a força de compressão a que foram submetidos é uma pressão relativamente alta em um período curto de tempo e pode ter interferido na viabilidade dos microrganismos (item 6.2.4.). Os resultados obtidos no pó efervescente probiótico produzido com cepas comerciais

(tabela 20), mostram um comportamento diferente das cepas produzidas no laboratório para obter o mesmo produto. Assim, o *L. acidophilus* teve uma queda de quase 3 ciclos logarítmicos e a *S. boulardii* se manteve praticamente estável, sugerindo que as condições de produção das cepas comerciais é menos eficiente do que as empregadas no laboratório, especificamente no caso do *L. acidophilus*.

6.2.3 Propriedades Físicas dos Comprimidos

Para um comprimido estar disponível no mercado, deve passar por inúmeros estudos e testes, assim a farmacopéia determina os limites aceitáveis para os vários critérios de qualidade em que a formulação deve apresentar para ser aprovada. Obedecendo aos critérios, tem-se a máxima garantia possível de que será produzido um produto que poderá ser utilizado com segurança pela população.

Abaixo, na tabela 21, são apresentados os valores médios para peso e dureza dos comprimidos obtidos em escala laboratorial:

Tabela 21 – Peso médio em gramas e dureza média em Newton (N) de 10 comprimidos efervescente probiótico.

Caracterização	Comprimido	Recomendado
Peso médio	0,694 ± 0,495%	Máx.: ± 5,0%
Dureza média	69,9	Min.: 30 N

O valor de peso médio obtido foi de 0,694 g e desvio padrão relativo de 0.495 %, estando de acordo com a Farmacopéia Brasileira que prevê uma variação de no máximo 5%.

Obteve-se uma dureza média de 69,9 N, sendo que mínima recomendada é de 30 N.

A tabela 22 apresenta os resultados para os valores de peso médio, dureza média, friabilidade e tempo de desintegração, dos comprimidos obtidos em escala industrial.

Tabela 22 – Caracterização Física para o Comprimido Efervescente Probiótico (formulação industrial).

Caracterização	Comprimido	Recomendado
Peso médio (g)*	0,948 ± 0,047%	Max. :± 5%
Dureza média (N)*	38,70	Mín.: 30
Friabilidade (% de perda de massa)*	0,066	Max.: 1,0%
Desintegração (min)**	1,33	Max.: 2,0

*valor médio de 10 comprimidos; **valor médio de 6 comprimidos

O resultado de peso médio encontrado foi de 0,948 g e desvio padrão relativo de 0,047 %, estando de acordo com a Farmacopéia Brasileira que prevê uma variação de no máximo 5%.

Obteve-se 38,7 N como valor médio da dureza dos 10 valores obtidos no durômetro, sendo a dureza mínima recomendada de 30 N. A dureza de um comprimido é proporcional ao logaritmo da força de compressão e inversamente proporcional à porosidade. Quanto maior a força de compressão, menor sua porosidade e maior serão a resistência, dureza e tempo de desagregação.

O valor obtido de friabilidade (grau de resistência que se manifesta em relação ao choque, atrito, rolamento, agitação e fricção) foi de 0,066, o que corresponde a uma perda de 0,66 % do peso inicial, sendo um valor dentro dos padrões recomendados que é de 1,0 % de perda máxima.

Em relação ao tempo de desintegração, que depende do mecanismo que age o desintegrante utilizado na formulação do comprimido, cinco comprimidos se desintegraram em menos de um minuto e apenas um demorou três minutos para se desintegrar, sendo concordante com o tempo máximo de dois minutos.

Quanto ao aspecto visual dos comprimidos, observou-se que ocorreu o problema de “capping” em alguns comprimidos, o que pode ter sido causado por fatores como pressão em excesso na compressão, presença de muito ar absorvido durante o processo, elevado número de partículas pequenas, falta de aglutinantes, granulado muito seco, cristais muito grandes, punções e matrizes rugosos ou com impurezas e/ou velocidade de compressão elevada (F. BRAS, 1988; BRANDÃO, 2001).

Pelas análises, o comprimido correspondeu aos requisitos tecnológicos, com fácil adaptação ao processo industrial e parâmetros farmacopeicos adequados (peso médio, dureza, friabilidade e desintegração).

6.2.4 Efeito da Força de Compressão na Viabilidade dos Probióticos

Na tabela 23 abaixo encontra-se o efeito da força de compressão na viabilidade de *S. boulardii* e *L. acidophilus*.

Tabela 23 – Efeito da força de compressão na viabilidade dos probióticos.

	<i>S. boulardii</i>	<i>L. acidophilus</i>
Pó antes da compressão – 0 N	10,86 a	10,51 b
Comprimido a 20 N	10,18 b	10,80 a
Comprimido a 40 N	8,93 c	8,19 d
Comprimido a 60 N	8,57 d	8,39 c
C.V. (%)	0,41	0,48

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Com o aumento da dureza, a contagem dos microrganismos foi inferior, uma vez que a força de compressão acima de 20 N interferiu na viabilidade dos probióticos. É provável que exista uma seleção da população mais resistente à

compressão que permanece viável acima de certos valores e neste caso aparentemente há um valor crítico de compressão entre 20 e 40 N que seleciona a população mais resistente, já que com 40 N e 60 N as contagens dos probióticos permaneceram praticamente as mesmas. Dependendo da pressão aplicada, a compressão das células pode causar dano à parede, a membrana e até perda da viabilidade, uma vez que sob estresse mecânico, algumas células podem não tolerar a essa compressão. Com o aumento da força aplicada, o dano ocorre no primeiro momento principalmente na parede celular e na medida em que esta pressão aumenta, atingirá também a membrana celular. Assim, tem sido observado que a viabilidade celular diminui quase linearmente com a força de compressão utilizada (CHAN; ZANG, 2002).

Por outro lado, Bora et al. (2009), observaram que houve queda na viabilidade dos esporos do probiótico *Bacillus coagulans* com aumento da força de compactação indicando que a sobrevivência também depende da espécie do probiótico e do diluente utilizado na formulação. Uma redução na viabilidade de diferentes linhagens de lactobacilos durante produção de comprimidos de culturas liofilizadas foi verificada por Maggi et al. (2000).

6.2.5 Efeito do Trato Gastrointestinal na Viabilidade dos Probióticos

Nas tabelas 24 e 25 são apresentados os valores de contagem de *L. acidophilus* e *S. boulardii* após contato com suco gástrico artificial e suco intestinal artificial, respectivamente.

Tabela 24 – Viabilidade de *L. acidophilus* e *S. boulardii*, aos zero, 30, 60, 90 e 120 min de contato com suco gástrico artificial.

	Contagem dos probióticos no suco gástrico (log n°UFC/mL)				
	Tempo de contato (min)				
	0	30	60	90	120
<i>L. acidophilus</i>	11.46	9.02	8.8	9.55	9.58
<i>S. boulardii</i>	10.22	8.61	8.64	9.54	9.82

Tabela 25 – Viabilidade de *L. acidophilus* e *S. boulardii* durante 150 min de contato com suco intestinal artificial.

	Contagem dos probióticos no suco intestinal (log n°UFC/mL)	
	Tempo de contato (min)	
	0	150
<i>L. acidophilus</i>	5,26	4,16
<i>S. boulardii</i>	8,42	8,33

Durante o período de 120 minutos em que o *Lactobacillus acidophilus* esteve em contato com o suco gástrico artificial, houve queda no log n°UFC com o decorrer do tempo, passando de 11,46 inicialmente para 9,58 após 120 minutos de contato. Na sequência, quando este probiótico foi inoculado do suco gástrico para o suco intestinal, houve uma queda considerável de log n° UFC 9,58 para 5,26, devido à diluição ocorrida no teste e provavelmente devido à mudança brusca de pH, de 2,0 no suco gástrico para 6,8 encontrado no suco intestinal, além do efeito que a presença de sais biliares neste último poderiam causar.

Cabe mencionar, entretanto, que o mecanismo de tolerância aos sais biliares não é completamente compreendido e é difícil definir uma concentração máxima a que um microrganismo deva suportar para ser considerado bile-resistente, uma vez que a concentração desta substância não é estática, variando em função do tempo e em diferentes partes do intestino. Sabe-se que a fluidez das membranas é temperatura dependente, permitindo a entrada de maiores concentrações de sais

biliares em temperaturas mais elevadas. Assim sendo, o efeito bactericida dos sais biliares depende da linhagem do microrganismo (MARTEAU et al. 1997; MADUREIRA et al., 2005; MARTINS et al., 2005).

Entretanto, cabe salientar que, durante os 150 minutos que o probiótico ficou em contato com o suco intestinal artificial, a contagem permaneceu praticamente constante, uma vez que permaneceu a população viável com tolerância maior aos sais biliares.

Madureira et al. (2005) observaram que *Lactobacillus acidophilus* LAC-1 quando pré-incubada em suco gástrico artificial por 120 minutos, ocorreu queda na contagem do número de células viáveis de aproximadamente 3 ciclos logarítmicos e nos subsequentes 30 minutos em contato com sais biliares.

Por outro lado, *Saccharomyces boulardii* apresentou uma pequena queda em sua contagem após permanecer, durante 120 minutos, em contato com o suco gástrico artificial. Porém, ao passar para o suco intestinal artificial, sua contagem diminuiu, principalmente devido à diluição exigida pelo teste, mantendo-se praticamente constante durante os 150 minutos que esteve em contato com o suco intestinal artificial. O que indica maior resistência das leveduras quando comparadas às bactérias.

6.3 DESENVOLVIMENTO DE INGREDIENTE EFERVESCENTE PROBIÓTICO

Em testes prévios, experimentos indicaram que o ácido tartárico interfere no crescimento dos microrganismos em estudo, assim, optou-se pela utilização do ácido cítrico, juntamente com bicarbonato de sódio, na proporção 1:1, para a efervescência. Para cada quantidade de produto em pó necessário na preparação de 1,0 L. ou no mesmo volume de um refresco líquido, haveria que adicionar 6,0 g de bicarbonato de sódio; 6,0 g de ácido cítrico; *Saccharomyces boulardii* e *Lactobacillus acidophilus* em pó, suficiente para atingir uma concentração de 10⁷ (UFC/L). O ingrediente probiótico efervescente também poderia ser disponibilizado na forma de sachê de 2,5 g por copo de 200 mL de refresco (1,2 g de ácido cítrico, 1,2 g de bicarbonato de sódio e 0,1 g de probiótico em pó)

Tabela 26 – Estabilidade de *L. acidophilus* e *S. boulardii* em refresco comercial durante 48 h.

	0 h	0,75 h	3 h	7 h	12 h	24 h	48 h
Marca A							
<i>L. acidophilus</i>	4,45	3,77	4,26	4,11	4,11	3,85	3,78
<i>S. boulardii</i>	6,34	6,48	6,34	6,30	6,43	6,48	7,11
Marca B							
<i>L. acidophilus</i>	4,48	4,62	4,56	4,20	4,26	4,45	4,23
<i>S. boulardii</i>	6,20	5,95	5,83	5,83	5,86	5,90	6,30

valores expressos em log UFC/mL

Na tabela 26, observa-se que os microrganismos mantiveram contagem constante, com pequena queda na contagem da bactéria, sendo ideal o consumo desse produto até 48 h.

Neves (2005) desenvolveu um fermentado probiótico de suco de maçã com *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus* em suco clarificado de maçã, das variedades Gala e Fuji e observou que o produto mantém a viabilidade dos probióticos durante armazenamento por 28 dias sob refrigeração. Em estudos de crescimento e viabilidade de duas espécies de *Lactobacillus* em suco de maçã clarificado observou-se que o *L. casei* apresentou maior número de unidades formadoras de colônia no suco de maçã gala que o *L. acidophilus*.

7 CONCLUSÕES

- Independente do processo de desidratação e dos veículos utilizados na secagem, a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* foi mais afetada que a da *Saccharomyces boulardii*, durante os 2 meses de armazenamento a 5 °C e 60% UR;
- Para os tratamentos testados, a maior queda de concentração dos microrganismos probióticos, ocorreu durante os quinze primeiros dias de armazenagem sendo mais acentuada para as amostras que foram liofilizadas sem um veículo;
- Leite desnatado mostrou-se um importante veículo na liofilização para a obtenção de uma boa viabilidade e estabilidade para *L. acidophilus*;
- O desenvolvimento do *Lactobacillus acidophilus* foi afetado negativamente, mas não de forma significativa, pelo ácido tartárico, ácido cítrico, e a sacarose. Entretanto, o aroma de laranja apresentou um efeito negativo significativo no desenvolvimento desta bactéria;
- O soro de leite, o adoçante “Stevia”, a polivinilpirrolidona (PVP) e o manitol corado, apresentaram um efeito positivo não significativo sobre o crescimento o *Lactobacillus acidophilus*, sendo que o bicarbonato de sódio afetou significativamente seu crescimento;
- Os ingredientes que apresentaram efeitos negativos para o crescimento de *S. boulardii* foram o ácido tartárico, ácido cítrico, PVP, adoçante “Stevia” e o aroma de laranja, sendo este o único com efeito significativo. Já os que apresentaram efeitos positivos, mas não significativos, foram o bicarbonato de sódio, sacarose, soro e manitol corado;
- Os microrganismos probióticos presentes no ingrediente efervescente, se mantiveram estáveis durante 48 h em refresco líquido;
- Durante os dois meses de armazenamento a 25 °C em embalagens de plástico fechados, ocorreu queda mais expressiva na contagem dos probióticos no comprimido efervescente probiótico do que no pó efervescente probiótico;
- Houve queda na contagem dos microrganismos com o aumento da força de

compressão acima de 20 Newtons;

- O comprimido apresentou parâmetros farmacopeicos adequados: peso médio ($0,948 \pm 0,047\%$ g), dureza(38,70 N), friabilidade (0,066 %) e desintegração (1,33 min);
- A desidratação em estufa com circulação de ar, utilizando amido de milho ou carbonato de cálcio como veículo, apresenta-se como um método econômica e tecnologicamente viável na produção de microrganismos probióticos em pó;
- O ingrediente efervescente probiótico e o pó efervescente probiótico mostraram-se mais promissores do ponto de vista industrial, com obtenção de uma melhor viabilidade durante o armazenamento do produto, além de não necessitarem de ingredientes (talco, estearato de magnésio, PVP) e equipamentos (compressor, durômetro, desintegrador, friabilômetro) para produção do comprimido, significando um menor investimento.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIAS, M.; BENABARRE, A.; TEIXIDÓ, N.; USALL, J.; VIÑAS, I. Effect of freeze-drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. **Internat. J. Of Food Microbiol.**, v.65, p.173-182, 2001.

AL-MOHIZEA, A.M.; AHMED, M.O.; AL-JENOobi, F.I.; MAHROUS, G.M./ ABDEL-RAHMAN, A.A. Formulation and evaluation of dried yeast tablets using different techniques. **Eur. J. of Pharm. and Biopharm.**, v.67, p.251-259, 2007

ARRUDA, P.V.; RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólico. **Rev. Analytica**, n.26, p.56-62, 2007

AULTON, M.E. Pré-formulação farmacêutica: delineamento de formas farmacêuticas. 2 ed. Porto Alegre: Artmed;.2005

AXELSSON, L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S., VON WRIGHT, A. (eds) **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, Inc., p.1-64, 1993.

BAPTISTA, A. S. *Saccharomyces cerevisiae* em milho armazenado e o efeito na redução de aflatoxinas. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 81p , 2001.

BARRETO, G. P. M.; SILVA, N.; SILVA, E. D.; BOTELHO, L.; YIM, D. K.; ALMEIDA, C. G.; SABA, G. L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobactérias e Bactérias Totais em Produtos Probióticos Comercializados no Brasil. **Braz. J. Food Tech.**, v.6, n.1, p.19-126, jan./jun. 2003.

Berny, J.F., Hennebert, G.L. Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze drying: effects of protectants and cooling rates. **Mycologia** v.83,p.805–815, 1991.

BLUMER, S. A. G. Enriquecimento com ferro em *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo Piracicaba, 53p., 2002.

BORA, P.S.; PURI, V.; BANSAL, A.K. Physicochemical Properties and Excipient Compatibility studies of Probiotic *Bacillus coagulans* Spores. **Sci. Pharm.**v.77, p. 625-637, 2009.

BRANDÃO, A. C. da C. Ensaio para laboratório de controle da qualidade e controle da produção de medicamentos, 2001. Disponível em: <
http://www.boaspraticasfarmaceuticas.com.br/includes/ensaios_lab_medicamentos>
Acesso em: 24 abr. 2010.

BUTS, J-P. Ejemplo de un medicamento probiótico: *Saccharomyces boulardii* liofilizada. **Rev. Gastroenterol. Perú** v.25 n.2, Lima abr./jun., 2005.

- CAMPOS, A. K.; MOTA, M. A. ; ARAUJO, J. V.; CECON, P. R. Atividade predadora, crescimento radial e esporulacao de fungos predadores de nematóides *Monacrosporium* ssp, submetidos a criopresevacao. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v.34, n.2, p.465-469, mar-abr, 2004.
- CANTERI, M. G., ALTHAUS, R. A., VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTI, E. A., GODOY, C. V. SASM - Agri : Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft - Knott, Tukey e Duncan. *Revista Brasileira de Agrocomputação*, v.1, n.2, p.18-24. 2001.
- CARVALHO, A.S.; SILVA, J.; HO, P.; TEIXEIRA, P.; MALCATA, F.X.; GIBBS, P. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bactéria. **Intern. Dairy J.** v.14, p.835-847, 2004.
- CHAN, E.S.; ZHANG, Z. Encapsulation of Probiotic Bacteria *Lactobacillus Acidophilus* by Direct Compression **Food and Bioproducts Processing**, v.80p,p. 78-82, 2002
- CURY, B. S. F. ; SILVA JÚNIOR, N.P.; CASTRO, A. D. Influência das propriedades de granulados de celulose nas características físicas dos comprimidos - **Rev. Ciênc. Farm. Bás. Apl.**, v.29, n.1, p.37-44, 2008
- DE LA PEÑA, P.; BARROS, F.; GASCÓN, S.; LAZO, P.S.; RAMOS, S. Effect of yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **The J. of Biolog. Chemistry**, Bethesda, v.256, n.20, p.10420-10425, 1981.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4. ed São Paulo: Atheneu, parte I, 1988
- FILHO – LIMA, J.V.M.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R. Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* subsp. Typhimurium in gnotobiotic mice. **J. of Applied Microb.**, v.88, p.365-370, 2000.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO) OF THE UNITED NATIONS AND WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, 2002.
<http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf> Acesso em: 28 jun. 2009.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF M.; DESTRO, M. T. **Microb. dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996.
- GIRALT, J., PEREZ REGADERA, J., ROMERO, J., VERGES, R., DE LA FUENTE, I., BIETE, A., ARENAS, M., COBO, J., GUARNER, F. Double-blind, multicenter, randomized, placebo-controlled nutritional trial of the efficacy of fermented milk with the probiotic *Lactobacillus casei* in preventing radiation-induced diarrhea in patients with gynecologic cancer treated with pelvic radiotherapy. **Int. J.Radiat. Oncol. Biol. Phys.** v.66,p.S-129, 2006.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Biotec. Alimentar**: Boletim de Tecnologia, v.101, p.12–22. 2002.

GOULET, O. Effets de *Saccharomyces boulardii* dans le traitement et la prevention des diarrheas de l'enfant. **J. de pédiatrie et de puériculture** , v.22, p.337-340, 2009.

HAMILTON-MILLER, J. M. T., SHAH, S., e WINKLER, J. T. Public health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. **Public Health Nutrition**, v. 2, p.223–229, 1999.

HAVENAAR, R.; VELD, J.H.J.H.I. Probiotics: a general view. In: WOOD, B.J.B. (ed.) **The lactic acid bacteria in health e disease** . Vol 1. Amsterdam: Elsevier Applied Science Publishers, 1992.

JELEN, P.; LUTZ, S. Functional milk and dairy products. In: MAZZA, G., ed. Functional foods: biochemical and processing aspects. Lancaster: Technomic Publishing,. p.357-381,1998.

KAILASAPATHY, K., e RYBKA, S. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp: Their therapeutic potential and survival in yoghurt. **Australian J. of Dairy Techn.**, v.52, p.28–35, 1997.

KLAYRAUNG, S.; VIERNSTEIN, H.; OKONOGI, S. Development of tablets containing probiotics: effects of formulation and processing parameters on bacterial viability. **Intern. J. of Pharm.** , v.370, p.54-60, 2009.

KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimentos de alimentos probióticos. **Rev. Bras. de Ciênc. Farm.** v.44, n.3, jul./set.,p.329-347, 2008.

MAGGI, L.; MASTROMARINO, P.; MACCHIA, S.; BRIGIDI, P.; PIROVANO, F.; MATTEUZZI, D.; CONTE, U. Technological and biological evaluation of tablets containing different strains of lactobacilli for vaginal administration. **European of Pharm. and Biopharm.**, v.50, p.389-395, 2000.

MAGRO, M.L.M.; CORBACHO, J.M. M.; SORRIBES, C.H. et al. Las bacteriocinas de las bacterias lacticas 1: Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. **Alimentaria**, v.37, p.59-66, 2000.

MARTEAU, P.; MINEKUS, M.; HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, J.H. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. **J. Dairy Sci.**, v.80, p.1031-1037, 1997.

MARTINAC, B.; ZHU, H.; KUBALSKI, A.; ZHOU, X.; CULBERTSON, M.; BUSSEY, H.; KUNG, C. Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. *Cell Biology*, Madison, v.87, p.6228-6232, 1990.

MARTINS, F. dos S. ; BARBOSA, F. H. F.; PENNA, F.J.; ROSA, C.A.; NARDI, R.M.D.; NEVES, M.J.; NICOLI, J.R. Estudo do potencial de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes in vitro. **Rev, de Bio. E Ciênc. da Terra**, v.5, 2005.

MARTINS, F. dos S.; ROSA, C.A.; NICOLI, J.R.; MACHADO, D.C.C.; PENNA, F.J.; NEVES, M.J. Efeito do método de conservação na viabilidade, reativação. Colonização intestinal e efeito imunomodulador de dois produtos probióticos a base de leveduras. **Rev. Bras. Med.**, v.63, p. 36-41, 2006.

McMULLEN, L.M., STILES, M.E. Potencial for use of bacteriocin producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. **J. Food Prot.**, Ames, suppl., p.64-71, 1996.

MORETON, R.C. Excipients to the year 2000. In: Excipients and delivery systems for pharmaceutical formulations (KARSA, D.R.; STEPHENSON, R.A. eds.) Royal Society of Chemistry, p.13-22, 1995.

MOUNTZOURIS, K.C.; KOTZAMPASSI, K.; TSISTSIKOS, P.; KAPOUTZIZ, K.; FEGEROS, K. Effects of *Lactobacillus acidophilus* on gut microflora metabolic biomarkers in fed and fasted rats. **Clinical Nutrition**, v.28, p.318-324, 2009.

MULLER, J.L.; PROTTI, K.L.; MACHADO, M. da S.; LACERDA, L.L.V.de; BRESOLIN, T.M.B.; PODLECH, P.S. Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo air lift e shaker. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.27, p.688-693, 2007.

NACHAEGARI, S. K.; BANSAL, A.K. Coprocessed excipients for solid dosage forms. **Pharm.Techn.**, v.1, p.52-64, 2004.

NANASOMBAT, S.; SRIWONG, N. Improving viability of freeze-dried lactic acid bacteria using lyoprotectants in combination with osmotic and cold adaptation. **KMITL Sci. Tech. J.** , v.7 n. S1, p. 61-69, nov 2007.

NEVES, L.S. Fermentado probiótico de suco de maçã. Tese de Doutorado. Univ. Fed. do Paraná, Curitiba, 106 p, 2005.

PEREIRA, V.G.; GÓMEZ, R.J.H.C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 229-240, abr./jun, 2007.

PHILLISKIRK, G.; YOUNG, T. W. The occurrence of killer character in yeasts of various genera. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Dordrecht, v.41, n.2, p.147-151, 1975.

PIARD, J.C.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria-1.Oxygen metabolites and products from catabolism. **Lait**, v.71, p.525-541, 1991.

PIFFERI, G.; RESTANI, P. The safety of pharmaceutical excipients. **Il farmaco** , v. 58, p. 541-550, 2002.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.; LOBO, J.S. Tecnologia farmacêutica , v.1, 6ª. Ed.; Fundação Caloueste Gulbenkian, 2002.

RADLER, F.; HERZBERGER, S.; SCHONIG, I.; SCHWARZ, P. Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailli*. **J. of General Microb.**, London, v.139, n.495-500, 1993.

RAO, A.V.; SHIWNARAIN, N.; MAHARAJ, L. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. **Can. Inst. of Food Science and Tech. J.** , v.22, p. 345-349, 1989.

RICHARDSON, D. Probiotics and products innovation. **Nutrition and Food Science.**, London, n.4, p.27- 33, 1996.

RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **Intern. Dairy J.**, v. 12, p. 163-171, 2002.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Braz. J. of Pharm. Scienc.**, v. 42, n. 1, p. 01-16, 2006.

SANDHOLM, M.T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **Intern. Dairy J.**, n.12, p.173-182., 2002

SANTOS, W.L.M. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origen cárnico. Madrid: Universidade Complutense de Madrid, (Tese, Doutorado), 294p, 1993.

SCHLEIFER, K.-H.; EHRMANN, M.; BEIMFOHR, C., BROCKMANN, E.; LUDWIG, W. Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. **Int. Dairy J.**, v.5, p.1081-1094, 1995.

SCHREZENMEIR, J.; de VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. **Am. J. Clin. Nutr.** v.73, p.361-364, 2001.

SHAH, N. P.; LANKAPUTHRA W. E. V.; BRITZKYLE M. L.; KYLE W.S.A. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in comercial yoghurt during storage. **Int. Dairy J.** v.5, p.515 – 521, 1995

SILVA, A. V. A. da; FONSECA, S. G. da C.; ARRAIS, P. S. D.; FRANCELINO, E. V. Presença de excipientes com potencial para indução de reações adversas em medicamentos comercializados no Brasil. **Rev. Bras. de Ciênc. Farmac.**, v.44, n.3, p.397-405,jul./set, 2008.

SKIPPER, N.; BUSSEY, H. Mode of action of yeast toxins: energy requirement for *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin. **J. of Bacteriology**, Washington, v.129, n.2, p.668-677, 1977.

STADLER, M.; VIERNSTEIN, H. Optimization of formulation containing viable lactic acid bacteria. **Int. J. Pharm.** v.256, p. 117–122, 2003.

TEIXEIRA, P.C.; CASTRO, H.M.; MALCATA, F.X.; KIRBY, R.M. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* following spray-drying. **J. of Dairy Science** , v. 78, p. 1025-1031, 1995.

TENNEY, D. *Acidophilus*. Woodland Publishing, 26p., 1996.

THANTSHA, M.S.; CLOETE, T.E.; MOOLMAN, F.S.; LABUSCHAGNE, P.W. Supercritical carbon dioxide interpolymer complexes improve survival of *B. longum* Bb-46 in simulated gastrointestinal fluids. **Int. J. of Food Microb.**, v.129, p.88-92, 2008

TOLLER, A.B.; SCHMIDT, C.A. Excipientes à base de cellulose e lactose para compressão direta. **Disciplin. Scientia**, Santa Maria, v. 6, n.1, p. 61-80, 2005.

TSURUTA, T.; ISHIMOTO, Y.; MASUOKA, T. Effects of glycerol on intracellular ice formation and dehydration of onion epidermis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 858, p. 217-226, 1998.

VAN DER AA KÜHLE, A.; JESPERSEN, L. The taxonomic position of *Saccharomyces boulardii* as evaluated by sequence analysis of the D1/D2 domain of 26S rDNA, the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region and the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. **System. Appl. Microbiol.** V.26; p. 564-571; 2003.

VERHEUL, A., RUSSELL, N.J., HOF, R.V., ROMBOOTS, F.M., ABEE, T. Modifications of membrane phospholipid composition in nisinresistant *Listeria monocytogenes* Scott A. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.63, n.9, p.3451-3457, 1997.

ZÁRATE, G.; NADER-MACIAS, M.E. Viability and biological properties of probiotic vaginal lactobacilli after lyophilization and refrigerated storage into gelatin capsules. **Process Biochemistry**, v.41, p. 1779-1785, 2006.

ANEXO

ANEXO A

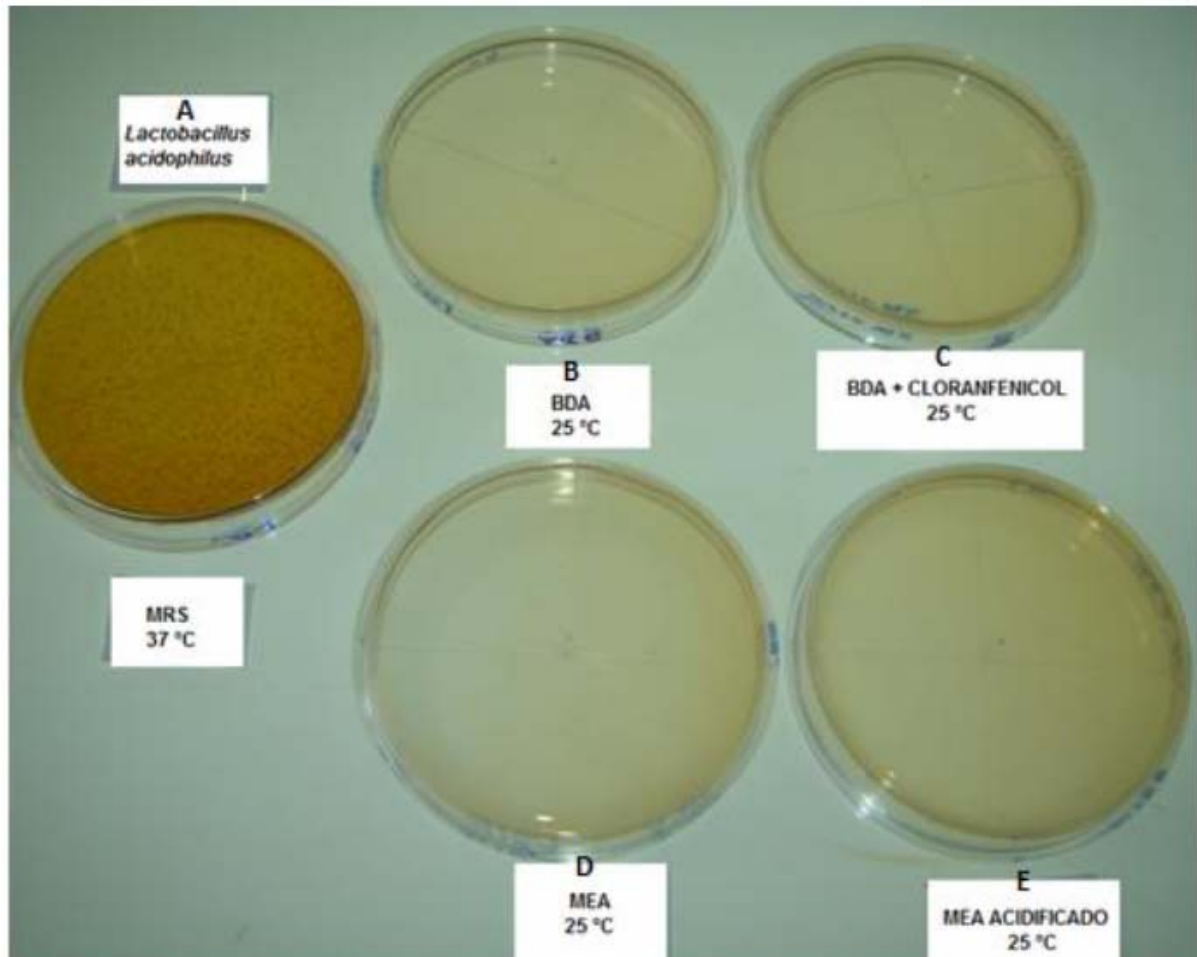


Figura 6 – Placa com MRS ágar inoculado com *Lactobacillus acidophilus* incubado a 37 °C (A) e placas de BDA (batata dextrose Agar) (B), BDA + cloranfenicol (C), MEA (malt extract Agar) (D), MEA acidificado (E) *Lactobacillus* inoculados com *L. acidophilus* incubado a 25 °C.

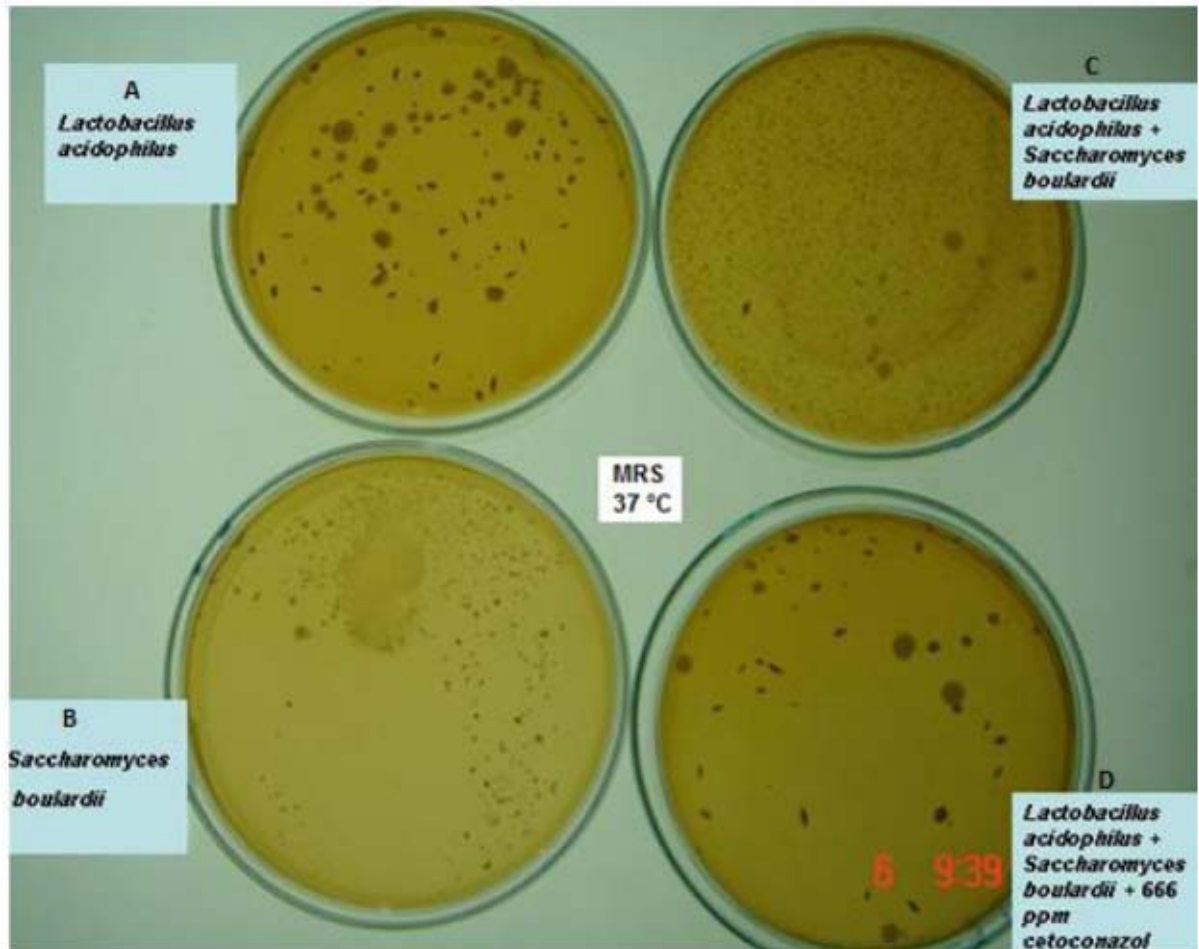


Figura 7 – Placas com MRS agar inoculadas com *Lactobacillus acidophilus* (A), *Saccharomyces boulardii* (B), *L. acidophilus* + *S. boulardii* (C) e *L. acidophilus* + *S. boulardii* + 666 ppm de cetoconazol (D), todos incubados a 37 °C.

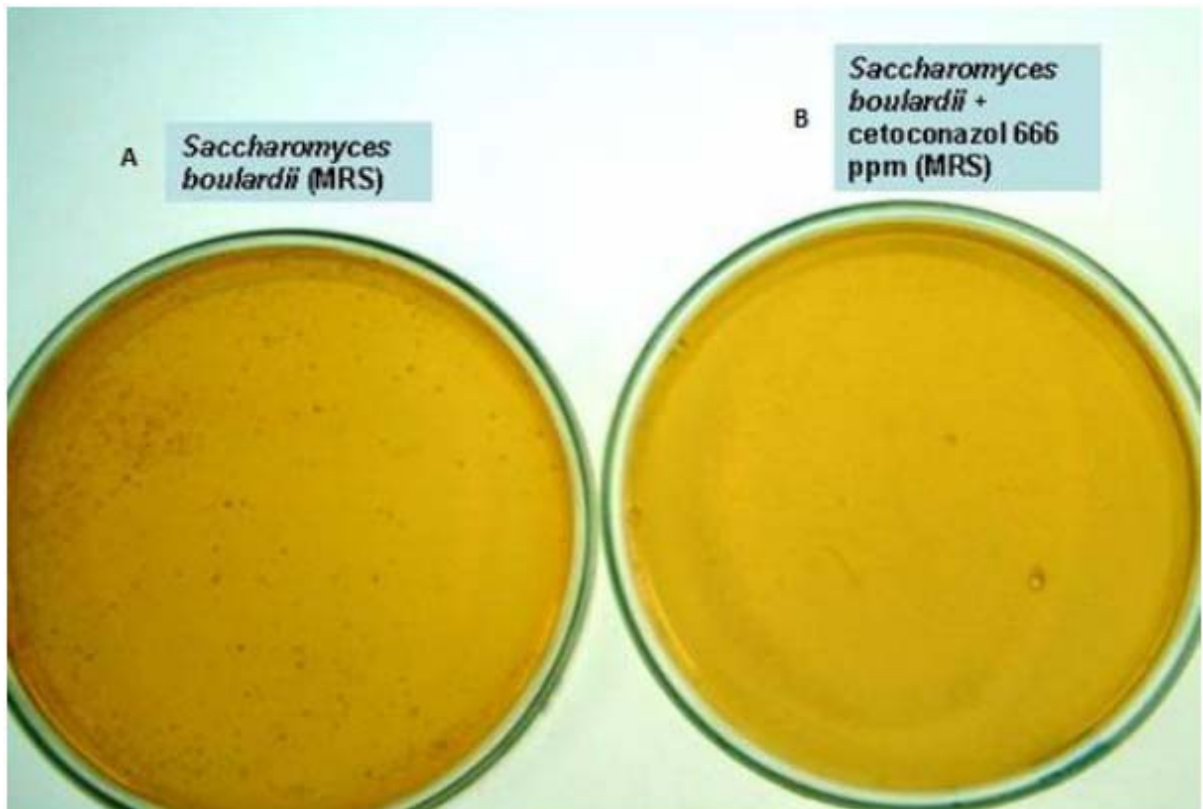


Figura 8 – Placas com MRS ágar inoculada com *Saccharomyces boulardii* (A) e com *S. boulardii* + cetoconazol 666 ppm (B), incubados a 37 °C.

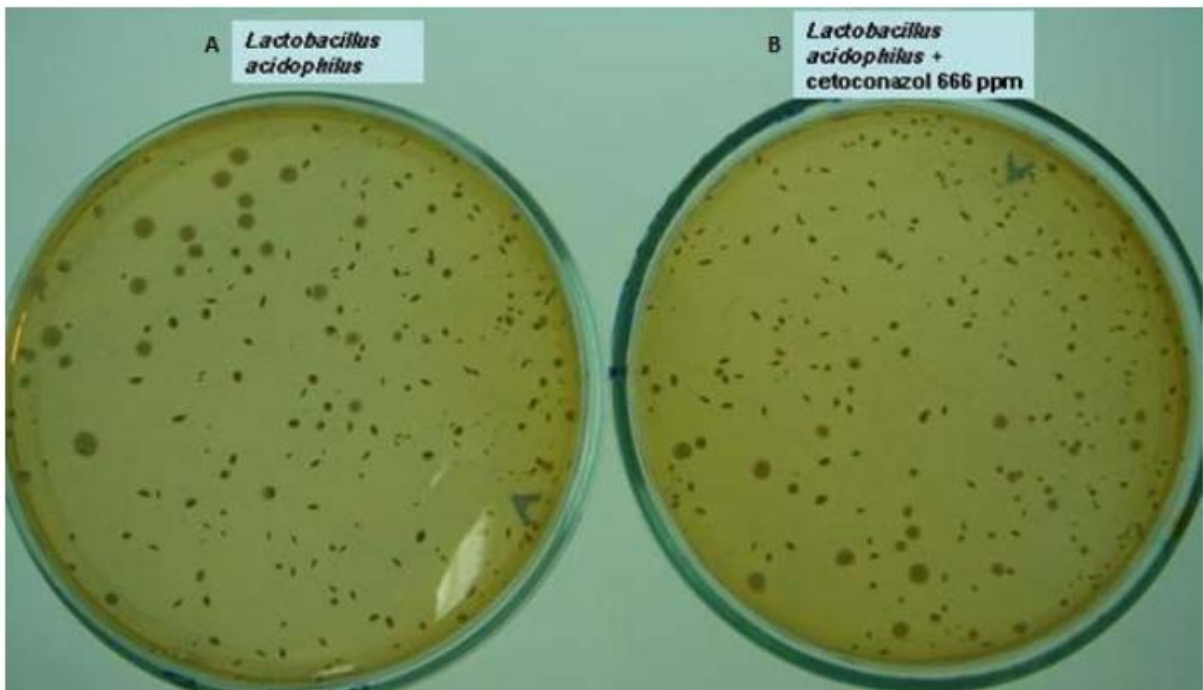


Figura 9 – Placas com MRS ágar inoculada com *Lactobacillus acidophilus* (A) e com *L. acidophilus* + cetoconazol 666 ppm (B), incubados a 37 °C.