

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

GUSTAVO COSTA MARGOTTI

EFEITO DO PROCESSO DE CONGELAMENTO NA VIABILIDADE DE
Saccharomyces boulardii IMOBILIZADA EM ALGINATO DE CÁLCIO

BAURU

2019

GUSTAVO COSTA MARGOTTI

EFEITO DO PROCESSO DE CONGELAMENTO NA VIABILIDADE DE
Saccharomyces boulardii IMOBILIZADA EM ALGINATO DE CÁLCIO

Trabalho de Conclusão de Curso de
Graduação apresentado como parte dos
requisitos para obtenção do título de
bacharel em Biomedicina - Universidade
do Sagrado Coração.

Orientador: Dr. Richtier Gonçalves da
Cruz.

BAURU

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com
ISBD

M329e	<p>Margotti, Gustavo Costa</p> <p>Efeito do Processo de Congelamento na Viabilidade de <i>Saccharomyces boulardii</i> Imobilizada em Alginato de Cálcio / Gustavo Costa Margotti. -- 2019. 32f. : il.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Richtier Gonçalves da Cruz</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP</p> <p>1. Probióticos. 2. S. Boulardii. 3. Esferas. 4. Viabilidade. 5. Produtos Congelados. I. Cruz, Richtier Gonçalves da. II. Título.</p>
-------	---

GUSTAVO COSTA MARGOTTI

EFEITO DO PROCESSO DE CONGELAMENTO NA VIABILIDADE DE
Saccharomyces boulardii IMOBILIZADA EM ALGINATO DE CÁLCIO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos requisitos
para obtenção do título de bacharel em
Biomedicina - Universidade do Sagrado
Coração.

Aprovado em: ___/___/___.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Richtier Gonçalves da Cruz (Orientador)
Universidade do Sagrado Coração

Prof. Dr. Alan Giovanini de Oliveira Sartori
Universidade de São Paulo

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre me ajudaram e me incentivaram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por toda ajuda e incentivo, se não fosse por eles eu não estaria onde cheguei.

À minha namorada por sempre estar comigo e ter me ajudado tanto nas horas que eu mais precisava.

À minha avó por sempre se preocupar comigo e ser um doce de pessoa.

Ao meu orientador por ter me orientado da melhor forma possível.

Aos meus amigos de classe Vitor, Larissa, Tainá, Liane, Bianca e Taynara.

RESUMO

Probióticos são definidos como produtos alimentares que contêm microrganismos vivos benéficos para a saúde. Estes aumentam o valor nutritivo e terapêutico dos alimentos, através do equilíbrio microbiano intestinal e das funções fisiológicas do trato gastrointestinal. O congelamento e o descongelamento de produtos probióticos pode causar danos às células como morte celular, inibição do desenvolvimento e a interrupção das atividades metabólicas. Entretanto, alimentos que estão em temperaturas mais baixas e encapsulados tem maiores taxas de conservação e de armazenamento, conseqüentemente, uma maior viabilidade. Neste contexto o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do processo de congelamento na viabilidade de *Saccharomyces boulardii*, servindo como estudo de base para o aumento da viabilidade de produtos probióticos congelados sem adição de leite ou derivados lácteos. Para isso, células de *Saccharomyces boulardii* obtidas foram expostas ao congelamento na forma livre e imobilizada em esferas de alginato de cálcio. Após diferentes dias sob o efeito do congelamento, as leveduras foram descongeladas e quantificadas pelo método de microplaqueamento. Os resultados obtidos foram expressos em Log UFC. O congelamento reduziu de forma significativa a contagem de células viáveis após um mês de ensaios, a imobilização não se mostrou eficaz em proteger as células, porém este estudo serve como base para mais estudos que adequem melhor a forma de imobilização celular e também os métodos de análises para este tipo de proteção.

Palavras-chave: Probióticos, *S. boulardii*, Esferas, Viabilidade, Produtos Congelados.

ABSTRACT

Probiotics are defined as food products that contain health-promoting living microorganisms. These increase the nutritional and therapeutic value of food through the intestinal microbial balance and the physiological functions of the gastrointestinal tract. Freezing and thawing probiotic products can cause cell damage such as cell death, inhibition of development and disruption of metabolic activities. However, foods that are at lower temperatures and encapsulated have higher conservation and storage rates, hence greater viability. The aim of the present study was to evaluate the effect of the freezing process on the viability of *Saccharomyces boulardii*, serving as a baseline study to increase the viability of frozen probiotic products without the addition of milk or dairy products. For this purpose, obtained *Saccharomyces boulardii* cells were exposed to freeze and immobilized on calcium alginate beads. After days of freezing, the yeasts were thawed and quantified by the microplating method. The results obtained were expressed in Log CFU. Freezing significantly reduced viable cell counts after one month of testing, immobilization was not effective in protecting cells, but this study serves as the basis for further studies that better suit cell immobilization and also methods of analyzes for this type of protection.

Keywords: Probiotics, *S. boulardii*, Spheres, Viability, Frozen Products.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Formação dos Eggbox a Partir da Complexação Iônica com Cátions de Cálcio.....	22
Figura 2 - Preparo das Esferas de Alginato de Cálcio.....	24
Figura 3 - Embalagem contendo esferas de Alginato de Cálcio esterificadas.....	24
Figura 4 - Linhas de tendência da condição de estresse congelamento.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Contagem de células viáveis de <i>Saccharomyces boulardii</i> livre e immobilizada submetida ao estresse congelamento.....	26
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FAO Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura

HDL Lipoproteína de Alta Densidade

LDL Lipoproteína de Baixa Densidade

PCR Reação em Cadeia da Polimerase

BOD Demanda Biológica de Oxigênio

YPD Extrato de levedura - Peptona - Dextrose

μL Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 JUSTIFICATIVA	15
3 OBJETIVOS	16
3.1 OBJETIVOS GERAIS	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
4 REVISÃO DE LITERATURA	17
4.1 PROBIÓTICOS.....	17
4.3 IMOBILIZAÇÃO	19
4.3.1 Alginato de Cálcio	20
5 METODOLOGIA	22
5.1 PREPARO DA SOLUÇÃO SALINA 0,85%.....	22
5.2 PREPARO DO ÁGAR YPD (Extrato de levedura - Peptona - Dextrose)	22
5.3 PREPARO DO CALDO YPD (Extrato de levedura - Peptona - Dextrose)	22
5.4 PREPARO DA <i>Saccharomyces boulardii</i>	23
5.5 PREPARO DA SACCHAROMYCES BOULARDII LIVRE E IMOBILIZADA.....	23
5.6 CONDIÇÃO DE ESTRESSE CONGELAMENTO	24
5.7 MICROPLAQUEAMENTO EM ÁGAR YPD	25
5.8 TRATAMENTO DE DADOS	25
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
7 CONCLUSÃO	29
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1 INTRODUÇÃO

Devido aos fatores modernos de urbanização, industrialização e globalização, a qualidade de vida das pessoas tende a ser muitas vezes prejudicada, com isso, a demanda de alimentos favoráveis à saúde no mercado vem aumentando durante os últimos anos. Os alimentos funcionais, onde os prebióticos e os probióticos se destacam, são os mais demandados pelas pessoas. (LORENZ, 2009).

Os alimentos funcionais são aqueles que além de fornecerem nutrição básica ao organismo, também geram benefícios à saúde através de mecanismos não previstos na nutrição convencional, restringindo-se apenas na prevenção e não na cura de doenças (WENDLING & WESCHENFELDER, 2013). Os principais ingredientes de um alimento funcional são óleos de peixe, esteróis de plantas, minerais, vitaminas, prebióticos e probióticos. Eles são os responsáveis pela funcionalidade desses alimentos (FERREIRA, 2001; THAMER e PENNA, 2006).

Os probióticos são definidos como produtos alimentares que contêm microrganismos vivos benéficos para a saúde (FAO, 2001). Além disso estes também aumentam o valor nutritivo e terapêutico dos alimentos, através do equilíbrio microbiano intestinal e das funções fisiológicas do trato gastrointestinal (SHAH, 2001).

A maioria dos probióticos no mercado tem em sua composição o principal microrganismo, as bactérias, mais especificamente, bactérias ácido lácticas. Elas são as mais utilizadas em diversos alimentos lácteos, tais como iogurte, queijos e leites fermentados em geral. Isso pode ser uma desvantagem para pessoas que possuem alguma restrição fisiológica ou ideológica quanto ao consumo de leite. (SHAH, 2001).

A *Saccharomyces boulardii* é praticamente a única levedura não patogênica mais comercializada com função probiótica. Porém, existem outras leveduras de origem ambiental ou agroindustrial com propriedades probióticas semelhantes ou até melhores, como por exemplo a *Saccharomyces cerevisiae* (CASSANEGO et al., 2015). Essa levedura tem características termotolerantes (cresce na temperatura de

37°C) e é muito utilizada na medicina humana. É utilizada tanto no tratamento quanto na prevenção de distúrbios gastrointestinais em geral, como diarreias causada por diversos fatores, e também na prevenção de doenças, tais como, doença de Crohn, amebíase aguda, entre outras (MARTINS et al., 2009).

A viabilidade dos microrganismos probióticos pode ser comprometida por diversos fatores como por exemplo, a temperatura de armazenamento, presença de conservantes e de outros microrganismos, pH, concentração de oxigênio no produto, entre outros fatores (SILVA, 2007).

O congelamento e o descongelamento de produtos probióticos pode causar danos às células como morte celular, inibição do desenvolvimento e a interrupção das atividades metabólicas. Entretanto, alimentos que estão em temperaturas mais baixas tem maiores taxas de conservação e de armazenamento, conseqüentemente, uma maior viabilidade (KOMATSU et al., 2008).

A técnica de imobilização é uma alternativa para garantir uma maior sobrevivência e viabilidade desses microrganismos, consiste em alojar dentro ou na superfície de um agente imobilizador células ou enzimas. As matrizes mais utilizadas para a imobilização são o gel de alginato de cálcio ou K-carragena (BATISTA, 2005; TAMPION e TAMPION, 1988).

Neste contexto o objetivo do presente trabalho é avaliar o efeito do processo de congelamento na viabilidade de *S. boulardii*, servindo como estudo de base para o aumento da viabilidade de produtos probióticos congelados sem adição de leite ou derivados lácteos.

2 JUSTIFICATIVA

A indústria de laticínios vem cada vez mais se destacando no mercado de alimentos funcionais, tendo uma grande variedade de produtos lácteos com adição de prebióticos e probióticos como por exemplo, os iogurtes e os leites fermentados em geral. Tal fato se deve ao efeito protetor que a matriz do leite fornece aos microrganismos probióticos durante o processamento e estocagem de alimentos, o que permite que estes se apresentem de forma viável para ingestão. Entretanto, o consumo desses produtos lácteos pode causar efeitos negativos em indivíduos intolerantes à lactose e alérgicos a derivados do leite. Além disso, indivíduos veganos também apresentam restrições ao consumo desses alimentos devido suas crenças éticas e sociais (WENDLING & WESCHENFELDER, 2013).

Por isso o desenvolvimento de alimentos probióticos congelados sem adição de leite pode apresentar-se como um nicho de mercado promissor.

Alimentos congelados tais como sorbets, tortas, picolés entre outros podem ser uma sugestão para o desenvolvimento de alimentos probióticos, tendo como desafio a manutenção da viabilidade desses microrganismos durante a estocagem e processamento em baixas temperaturas (KOMATSU et al., 2008).

Uma alternativa combinada com o congelamento que pode garantir uma maior viabilidade e sobrevivência da *Saccharomyces boulardii* é a imobilização da mesma em gel de alginato de cálcio (CANILHA et al., 2006). Esta técnica consiste em alojar dentro ou na superfície de um agente imobilizador células ou enzimas. As matrizes mais utilizadas para a imobilização são o gel de alginato de cálcio ou K-carragena (BATISTA, 2005; TAMPION e TAMPION, 1988).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Estudar o efeito do processo de congelamento na viabilidade de *Saccharomyces boulardii* livre e imobilizada em esferas de Alginato de Cálcio.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Imobilizar em esferas de alginato de cálcio o microrganismo *Saccharomyces boulardii*.
- Submeter o microrganismo *Saccharomyces boulardii*, imobilizado e livre em esferas de alginato de cálcio ao processo de congelamento.
- Avaliar a viabilidade da *Saccharomyces boulardii* submetida ao processo de congelamento.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 PROBIÓTICOS

O termo probiótico tem origem do latim, pro ("a favor") e do grego, bios ("vida"). Em 1974, Parker definiu probióticos como microrganismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal, porém, as "substâncias" poderia incluir alguns suplementos como antibióticos, uma substância com efeito e função opostas ao dos probióticos, então essa definição foi abandonada (NOGUEIRA & GONÇALVES, 2011).

Mais tarde em 1989, Fuller propôs que os probióticos eram suplementos alimentares que continham microrganismos vivos capazes de favorecer beneficemente o hospedeiro, assim estabelecendo o equilíbrio da microbiota intestinal. Entretanto, os autores limitaram o uso do termo probiótico em produtos que continham células viáveis de microrganismos capazes de exercer efeitos no trato digestivo, proporcionando saúde para humanos ou animais que ingerissem o probiótico (HAVENAAR & HUIS IN'T VELD, 1992).

Só em 2001, a definição mais aceita atualmente para probióticos é que eles são microrganismos vivos que conferem benefícios ao indivíduo, quando consumidos em quantidades adequadas (FAO/WHO, 2001).

No trato gastrointestinal, há aproximadamente 400 espécies de bactérias que habitam-no e são separadas em duas categorias: As bactérias patogênicas, que são consideradas nocivas para a saúde; e as bactérias probióticas, benéficas à saúde (GISIGER, 2015).

Existem alguns critérios para que o microrganismo seja considerado um probiótico, tais como: não apresentar patogenicidade, ser estável, viável, produtor de ácido e ácido resistente, resistindo a ação da bile e as condições do trato gastrointestinal. Outros critérios que o microrganismo precisa ter para ser considerado um probiótico são: ser Gram positivo e apresentar especificidade ao hospedeiro (GISIGER, 2015).

O uso de microrganismos probióticos vem sendo cada vez mais comum atualmente, tanto na forma alimentar, quanto na forma medicamentosa, como no caso de bactérias (*Lactobacillus*) e leveduras (*S. boulardii*). O consumo desses produtos probióticos tem a capacidade de diminuir o colesterol circulante do

organismo humano, mais especificamente, bactérias ácido lácticas promovem o aumento considerável no HDL (lipoproteína de alta densidade) e diminuem a concentração dos níveis de LDL (lipoproteína de baixa densidade) (PEDROSO, 2011).

Seu efeito medicamentoso exercido por esses microrganismos é mais utilizado na recomposição da microbiota intestinal após tratamento com antibióticos de amplo espectro, em diversos tipos de diarreias e outros usos (PEDROSO, 2011).

O mecanismo de ação do probiótico ainda não está totalmente estabelecido, embora tenham sido formulados alguns processos que podem atuar independentemente ou associados. Um deles é a exclusão competitiva, onde o probiótico compete com o microrganismo patogênico por sítios de fixação e nutrientes, consequentemente impedindo sua ação. Porém, para obter-se a exclusão competitiva eficiente é necessário a administração elevada e contínua de doses do probiótico (COPPOLA & TURNES, 2004).

Os probióticos também podem sintetizar bacteriocinas, ácidos orgânicos, e peróxido de hidrogênio, afetando patógenos. Também podem atuar sobre o metabolismo celular, reduzindo a concentração de amônia no organismo, liberando enzimas como a lactase (COPPOLA & TURNES, 2004).

Além da *Saccharomyces boulardii*, outros microrganismos como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* tem aplicação como probióticos. A levedura *S. boulardii* não pertence à microbiota intestinal dos humanos, mas consegue sobreviver e atuar na região do cólon. Não conseguem colonizar essa região pois, a microbiota intestinal local impede tal ação. Essa levedura não altera a microbiota, é eliminada do cólon após a interrupção da sua ingestão e por apresentar alguns benefícios a saúde (LOPES & PINTO, 2010).

permaneceria como uma espécie à parte. Algumas pesquisas utilizando reação em cadeia polimerase (PCR) demonstravam que a *S. boulardii* tinha muitas diferenças em comparação com a *S. cerevisiae* (PEDROSO, 2011).

A levedura mantém-se viável em pH 2,0 extremamente ácido, já a *S. cerevisiae* decresce sua viabilidade em pH 6,0; 3,0 e 2,0. A resistência da *S. boulardii* a baixos valores de pH permite sua maior sobrevivência ao entrar em contato com o conteúdo estomacal, aumentando a quantidade de células viáveis que alcançarão o intestino (LOPES & PINTO, 2010).

Pelo fato da *S. boulardii* ser um microrganismo eucarionte, ela apresenta algumas especificidades que diferenciam das bactérias que são microrganismos procariontes, como por exemplo, possuir um tamanho dez vezes maior, sendo um obstáculo para as bactérias; apresentar resistência natural a antibióticos e também não transferir material genético, sendo uma ação característica de microrganismos procariontes que ocasiona a troca de genes resistentes a antibióticos (KITAMURA, 2013).

Os principais mecanismos de ação da *S. boulardii* são: inibição de crescimento, aderência e ação em produtos de bactérias patogênicas. A clivagem da toxina A de *C. difficile* pela produção de serina protease é um exemplo de como a *S. boulardii* age em produtos de bactérias patogênicas (KITAMURA, 2013).

4.3 IMOBILIZAÇÃO

A imobilização de células em uma determinada matriz é a técnica mais amplamente utilizada para a imobilização de células viáveis (BATISTA, 2005). Além de proteger as células da contaminação por fungos e bactérias, impede a ação de vários fatores como o pH extremos, pressão osmótica, enzimas, íons, calor, entre outros fatores (FREITAS, 2007).

Todos os métodos de imobilização interferem nas atividades metabólicas, de crescimento e na fisiologia de bactérias, leveduras e fungos. Essas interferências promove a formação de inoculantes de fácil manuseio, aplicação e transporte. As células imobilizadas permanecem viáveis por mais tempo quando armazenadas por longos períodos (BASSANI, 2018).

As técnicas empregadas na imobilização de células podem ser divididas em quatro categorias principais com base nos mecanismos físicos empregados: fixação em suporte sólido; contenção dentro de uma matriz porosa; agregação através da floculação natural ou artificial e retenção de células através de barreiras (SOUZA JUNIOR, 2006).

A contenção de células por meio de uma matriz porosa impede que as mesmas se difundam no meio circunvizinho, porém ainda permitem a transferência de nutrientes e metabólitos. Alguns exemplos de contenção por meio de uma matriz porosa são os géis de polissacarídeos como alginato, ágar, chitosan e ácido poligalacturônico (SOUZA JUNIOR, 2006).

A floculação é uma metodologia de imobilização que tem como princípio agregar células para formar uma unidade maior ou formar grupos que sedimentam-se rapidamente. A capacidade de formar agregados de células é observada principalmente em fungos e células de plantas. Essa metodologia é mais utilizada em processos industriais, como por exemplo na indústria de cerveja (SOUZA JUNIOR, 2006).

A imobilização por um suporte sólido pode ser realizada por interações iônicas ou absorptivas, e também por ligações covalentes. As ligações por meio de interações iônicas ou absorptivas são mais fracas, portanto é um processo mais barato e simples. Já a imobilização por meio de ligações covalentes é mais forte, tendo a possibilidade de promover danos à membrana das células imobilizadas (GROBOILLOT et al., 1994).

Retenção de células através de barreiras pode ser realizada por uso de membranas com microporos, de forma que as células fiquem aprisionadas em microcápsulas. As principais desvantagens desse método são: limitações de transferência de massa e obstrução da membrana causada pelo crescimento das células (SOUZA JUNIOR, 2006).

4.3.1 Alginato de Cálcio

O alginato é um copolímero linear cuja suas propriedades são extraídas da parede celular de algas marinhas marrons. É constituído por sais de ácidos algínicos, sendo o ácido manurônico (M) e o ácido gulurônico (G). Poderá ocorrer a ligação entre esses dois ácidos e conseqüentemente, a formação de blocos homopoliméricos M-M e G-G ou heteropoliméricos M-G. O comprimento e o número de blocos determinaram as propriedades físicas do alginato (ORTIZ, 2017).

A gelificação do alginato é feita a partir de trocas catiônicas, dos íons sódio e cálcio. Existem várias pesquisas relacionadas a estudos com alginato de cálcio que aceitam que a rede de gel (Figura 1) é induzida pela ligação do cátion cálcio pela cadeia de segmentos do grupo G, formando junções estáveis, rede tridimensional, constituída dos principais dímeros (ROY e GUPTA, 2004).

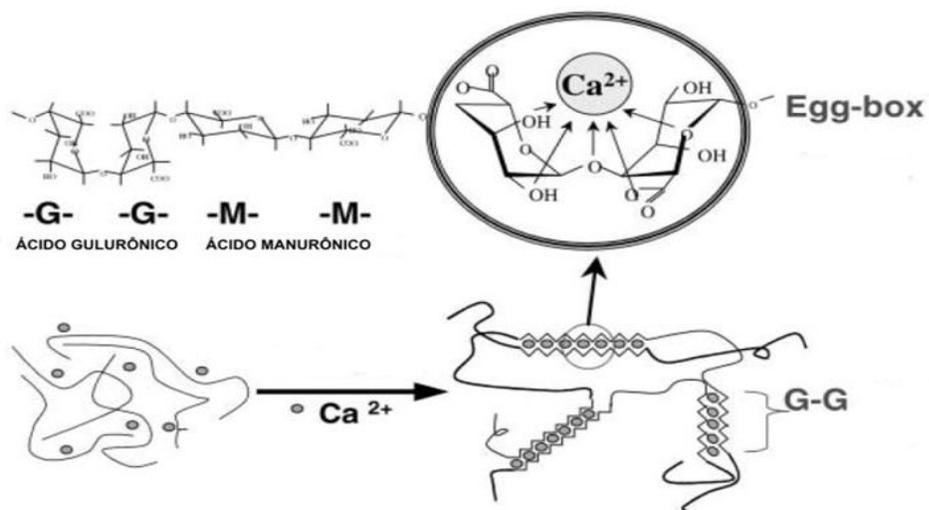


Figura 1 - Formação dos Eggbox a partir da complexação iônica com cátions de cálcio (DANTAS, 2015).

Basicamente, as propriedades do gel são: resistência mecânica e porosidade, necessárias para processo. A porosidade no gel tem a função de proteger as células e modificar a difusividade efetiva do substrato (FREITAS, 2007).

5 METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Alimentos da Universidade do Sagrado Coração, situado em Bauru.

5.1 PREPARO DA SOLUÇÃO SALINA 0,85%

Para preparar a solução salina a 0,85% foi necessário homogeneizar 15,3 gramas de Cloreto de Sódio em 1,8 litros de água destilada com o auxílio de um agitador magnético até dissolução por completo. Em seguida, a solução preparada foi despejada em ependorffs de 900 μ L com tampa, e para garantir a esterilidade das soluções, os tubos foram autoclavados a 121°C por 15 minutos em autoclave. Depois que os tubos foram autoclavados, esperou-se 24 horas para que eles fossem resfriados, e em seguida foram identificados, datados e armazenados em geladeira doméstica entre 4 e 6°C.

5.2 PREPARO DO ÁGAR YPD (Extrato de levedura - Peptona - Dextrose)

Para preparar o ágar YPD foi necessário pesar 70 gramas de ágar YPD em pó, transferir para 1 litro de água destilada conforme indicado no rótulo da embalagem do ágar, foi aquecido e homogeneizado na chapa aquecedora até a dissolução completa. Logo após a dissolução, o ágar foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C, e depois esperou-se 24 horas para que o ágar fosse resfriado. Depois de 24 horas, o ágar foi retirado da autoclave e colocado em banho-maria a 37°C para reaquecer novamente, tornando-o líquido para a distribuição. Dentro da câmara de fluxo laminar, o ágar ainda no estado líquido foi distribuído em placas de Pétri estéreis, e esperou-se a secagem completa de todas as placas. As mesmas foram identificadas, datadas e armazenadas em geladeira doméstica entre 4 a 6°C.

5.3 PREPARO DO CALDO YPD (Extrato de levedura - Peptona - Dextrose)

Na preparação do caldo YPD, foi necessário pesar 10 gramas de extrato de levedura, 20 gramas de Dextrose (glicose), 20 gramas de peptona e homogeneizar

tudo em 1 litro de água destilada até a dissolução completa. Logo após a dissolução, o caldo YPD foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°. Depois disso, o caldo foi identificado, datado e armazenado em geladeira doméstica entre 4 a 6°C.

5.4 PREPARO DA *Saccharomyces boulardii*

A levedura *Saccharomyces boulardii* da marca Floratil em cápsulas foi obtida em uma farmácia convencional. No laboratório, a cápsula foi previamente higienizada com álcool 70% e em seguida adicionada em solução salina para suspender e assim poder utilizá-la nos processos de preparação seguintes. É constado na bula que cada cápsula de 200 mg de *S. boulardii* contém no mínimo 1×10^9 células viáveis.

No preparo foi necessário semear a suspensão feita em solução salina por esgotamento na placa de pétri com ágar YPD e incubar na BOD (modelo TE-391 da marca Tecnal) por 48 horas a 35°C. Após o termino da incubação foi coletada uma colônia isolada e adicionada em 100 mL de caldo YPD em um erlenmeyer. O erlenmeyer ficou sob agitação por 48 horas à 200 rpm e 35° C em mesa agitadora. Logo depois foi retirado 1mL dessa solução e transferiu-se para outro erlenmeyer com 100 mL de caldo YPD e reincubado novamente nas mesmas condições.

5.5 PREPARO DA SACCHAROMYCES BOULARDII LIVRE E IMOBILIZADA

Para o preparo da *Saccharomyces boulardii* livre e imobilizada a levedura foi transferida para tubos Falcon (tubos para a forma livre e tubos para a forma imobilizada). Os tubos foram centrifugados a 3600 rpm por 10 minutos, e após a centrifugação o sobrenadante formado foi dispensado, restando somente o precipitado. Adicionou-se solução salina (0,85%) até o volume inicial nos tubos e foram homogeneizados com auxílio do vortex.

No preparo das esferas de alginato foi adicionado alginato de sódio na suspensão de leveduras (1%) e em seguida esta foi gotejada com auxílio da pipeta pasteur em uma solução cloreto de cálcio a 2,5% estéril formando as esferas de alginato de cálcio conforme ilustrado na Figura 2 (CRUZ, 2013).

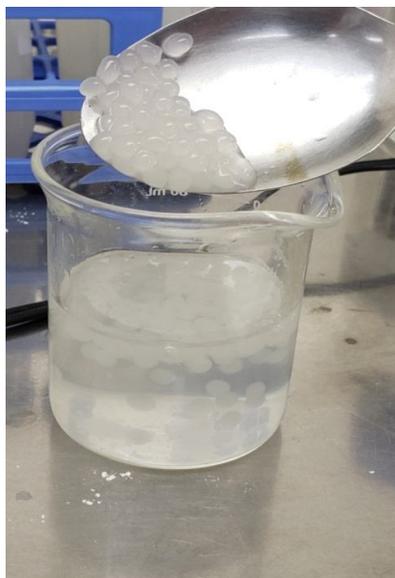


Figura 2 - Preparo das Esferas de Alginato de Cálcio.

As esferas de alginato de cálcio formadas foram transferidas para uma embalagem estéril para serem congeladas conforme ilustrado na Figura 3.



Figura 3 - Embalagem contendo esferas de Alginato de Cálcio esterificadas.

5.6 CONDIÇÃO DE ESTRESSE CONGELAMENTO

Para avaliar melhor os efeitos do congelamento e a viabilidade da *Saccharomyces boulardii* foram empregado diferentes tempos de tratamento ao congelamento como mostrado nos tópicos abaixo.

- Tratamento A: Antes de congelar a levedura.
- Tratamento B: 1 dia depois de congelar a levedura.
- Tratamento C: 30 dias após o congelamento da levedura.

A mistura livre de leveduras foi armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em um congelador doméstico (congelamento) por 1 dia e 1 mês. Neste período, a contagem foi determinada antes do congelamento, logo após o congelamento (HOMAYOUNI et al., 2008). A partir deste ponto, a mistura foi descongelada e foram realizadas diluições seriadas em solução salina (NaCl 0,85%) para a contagem de sobreviventes em ágar YPD sob condições anaeróbicas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Placas que continham entre 25 a 250 colônias foram selecionadas e as unidades formadoras de colônias (UFC.mL⁻¹) contadas e os resultados expressos em log₁₀. Os mesmos procedimentos foram feitos para as células de *Saccharomyces boulardii* imobilizada em esferas de alginato de cálcio.

5.7 MICROPLAQUEAMENTO EM ÁGAR YPD

Para que fosse realizado o plaqueamento, a *Saccharomyces boulardii* imobilizada e livre foram descongeladas e logo após, foi adicionado na forma imobilizada solução salina para que fosse realizada a diluição 10^{-1} . Colocou-se a forma imobilizada no homogeneizador de amostras e após a homogeneização foi feito diluições seriadas a partir da diluição 10^{-1} , distribuindo quantidade necessária da primeira diluição para segunda diluição e assim por diante até realizar a diluição 10^{-5} . Com o auxílio de uma pipeta automática foi pipetado 5 gotas de cada diluição na placa de pétri com ágar YPD, técnica denominada microplaqueamento. A placa foi incubada na BOD por 48 horas a 37°C e após a incubação foi feito a contagem das colônias e os resultados expressos em Log UFC.g⁻¹.

5.8 TRATAMENTO DE DADOS

Todos os ensaios foram realizados em quintuplicata e duas repetições, as médias foram submetidas ao teste de Tuckey ao nível de 5% de probabilidade pelo programa R para avaliar se haviam diferenças significativas entre elas. O experimento foi conduzido de forma inteiramente casualizada.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contagem de células viáveis de *Saccharomyces boulardii* livre e imobilizada submetidas à condição de congelamento em diferentes tempos de análise (Tratamento A, B e C) é mostrada na tabela 1.

Tabela 1 - Contagem de células viáveis de *Saccharomyces boulardii* livre e imobilizada submetida ao estresse congelamento.

Congelamento	Contagem (Log UFC.g ⁻¹)		
	Tratamento A	Tratamento B	Tratamento C
Livre	6,025 ^{a*}	5,45 ^a	3,6 ^b
Imobilizada	5,075 ^a	5,50 ^a	2,3 ^b

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Turkey a 5%.

A viabilidade da *Saccharomyces boulardii* imobilizada e na forma livre durante o congelamento por até 1 mês, é apresentado na Figura 4.

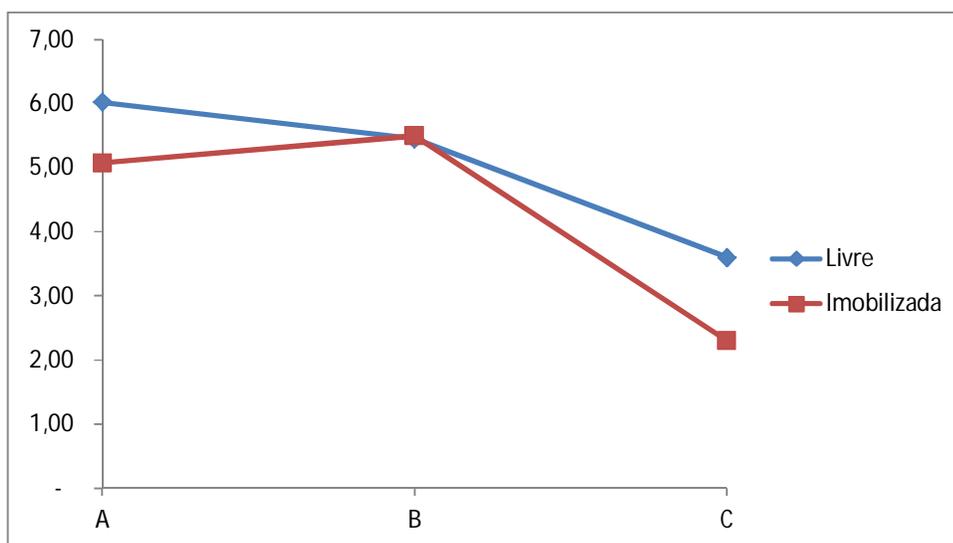


Figura 4 - Linhas de tendência da condição de estresse congelamento.

A contagem das células livres variou significativamente de 6,025 para 3,6, ao fim do experimento apresentando uma diferença de 2,425. Este mesmo

comportamento foi observado na contagem das células imobilizadas, a variação foi de 5,075 para 2,3, apresentando uma diferença de 2,775. Observa-se que a contagem das células imobilizadas depois do tratamento B foi praticamente igual a das células livres, porém no tratamento C houve uma queda brusca na contagem das células imobilizadas e livres.

Porém, observou-se que a *S. boulardii* na forma livre, mesmo a sua estabilidade ter caído praticamente pela metade obteve-se uma viabilidade e estabilidade maior em comparação com a forma imobilizada. A baixa viabilidade observada na forma imobilizada da *S. boulardii* se deve a não utilização de uma metodologia adequada que utiliza matrizes de alimentos que ajudam na manutenção da viabilidade celular em condições de baixas temperaturas. No estudo de Ames (2019) obteve-se resultados da viabilidade do microrganismo *Lactobacillus casei*, não havendo diferença significativa entre as diferentes formas de imobilização e diferentes temperaturas de armazenamento em até 30 dias. Isso se deve pela combinação das células imobilizadas com a matriz da aveia e compostos de biocatalisadores (proteínas, polissacarídeos), produzindo um biofilme com propriedades elásticas e viscosas.

Outra pesquisa que demonstra o potencial de manutenção da viabilidade, no microrganismo *Bifidobacterium animalis* é a de Reginato et al. (2011). Em 9 meses de armazenamento a -22°C a cultura do microrganismo citado anteriormente apresentou viabilidade em torno de $10 \log \text{UFC.mL}^{-1}$, esse resultado revela que a cultura possui boa estabilidade devido ao encapsulamento e a proteção da matriz do leite em alimentos funcionais como o leite microfiltrado e o smoothie.

Bastos et al. (2015) obteve resultados semelhantes em relação a *S. boulardii* na forma livre. Nessa pesquisa, compararam a viabilidade da população de *S. boulardii* liofilizado com a população de *L. acidophilus* liofilizado, e observou-se que a população de *S. boulardii* apresentou melhores resultados de viabilidade, visto que a sua população permaneceu estável, ocorrendo somente um pequeno declínio de 0,49 ciclos logaritmos, durante 8 semanas de armazenamento.

Segundo a legislação da ANVISA, para que um alimento probiótico tenha efeito, é necessário o consumo diário de no mínimo 10^8 a 10^9 de microrganismos viáveis em 100 g do produto (MACEDO et al., 2008).

Neste presente estudo observou-se que a *S. boulardii* na forma livre teve uma concentração celular de $3,6 \log \text{UFC.g}^{-1}$, e a forma imobilizada $2,3 \log \text{UFC.g}^{-1}$ em

30 dias. A metodologia pode não ter sido adequada somente para a forma imobilizada (BASTOS et al., 2015).

Mesquita (2018) em seu trabalho mostrou-se que em temperaturas abaixo de -20°C , há morte celular, assim podendo explicar a queda na contagem no tratamento C ao longo do tempo. Porém, mesmo as baixas temperaturas causando morte celular, o metabolismo celular pode se manter ativo, portanto o armazenamento das células em baixas temperaturas confere maior prolongamento a vida útil da cultura.

Segundo Bassani (2018), a combinação do encapsulamento dos microrganismos em esferas de alginato de cálcio com o armazenamento em baixas temperaturas previne significativamente a perda da viabilidade dos microrganismos. Nessa pesquisa comparou-se resultados obtidos por outra pesquisa que estudaram a viabilidade de *Lactobacillus plantarum* imobilizado em alginato de cálcio durante a estocagem a 4°C por 42 dias e verificaram a viabilidade superior a $5,5 \log \text{UFC.mL}^{-1}$.

No presente estudo não foi observado essa proteção das células, além de fatores inerentes a estrutura do microrganismo os métodos utilizados também podem não ter sido eficazes em avaliar a viabilidade do microrganismo imobilizado uma vez que a homogeneização não foi capaz de desfazer as esferas de alginato de cálcio, podendo então a contagem microrganismos ter sido subestimada. Além disso grande parte dos trabalhos que avaliam a viabilidade dos microrganismos probióticos consideram que a matriz do alimentos (muitas vezes o leite) também é um fator que pode ajudar a sobrevivência deste sendo que no presente estudo foi utilizada somente uma solução salina para os ensaios.

7 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o congelamento reduziu de forma significativa a contagem de células viáveis após um mês de ensaios, a imobilização não se mostrou eficaz em proteger as células sendo necessários, portanto mais estudos que adequem melhor a forma de imobilização celular e também os métodos de análises para este tipo de proteção são necessários. Além disso a simulação do estresse por congelamento em alimentos pode representar de uma forma mais fidedigna os resultados.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMES, C. W. Lactobacillus casei CSL3: imobilização celular em aveia e aplicação como cultura probiótica na produção de iogurte. **(Dissertação de Mestrado)**. Universidade Federal de Pelotas - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2019.

BASSANI, J. C. Imobilização de Células Microbianas em Esferas de Alginato de Cálcio e Avaliação da Viabilidade Celular e Estabilidade Bioquímica em Diferentes Condições de Armazenamento. **(Dissertação de Mestrado)**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2018.

BASTOS, G. A.; PAULO, E. M.; CHIARADIA, A. C. N. Estabilidade de microorganismos potencialmente probióticos em barra de cereais - efeito da técnica de incorporação. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n.2, p. 311-317, 2015.

BATISTA, M. A. Estudo da imobilização de células de *saccharomyces cerevisiae* em gel de alginato de cálcio no processo de fermentação alcoólica **(Dissertação de Mestrado)** Universidade Federal de Uberlândia, 2005.

BATISTA, M. A. Estudo da Imobilização de Células de *Saccharomyces cerevisiae* em Gel de Alginato de Cálcio no Processo de Fermentação Alcoólica. **(Dissertação de Mestrado)**. Universidade Federal de Uberlândia - Faculdade de Engenharia Química, 2005.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A. Biocatalizadores imobilizados. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v.9, n.36, p. 48-57. 2006.

CASSANEGRO et al. Leveduras: diversidade em kefir, potencial probiótico e possível aplicação em sorvete. **Ciência e Natura**. v.37, Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, 2015.

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

CRUZ, R. G. Estudo in vitro da viabilidade e da resistência ao trato gastrointestinal de *Lactobacillus acidophilus* imobilizado em esferas de alginato de cálcio adicionadas em queijo minas frescal **(Trabalho de Conclusão de Curso)**, Universidade Federal de Viçosa – Campus Rio Paranaíba, 2013.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder Milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2001. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>.

FAO/WHO. Health and Nutrition Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Córdoba, 2001. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>>. Acesso em: 21 abril. 2019.

FERREIRA, C. L. L. F. Tecnologia para produtos lácteos funcionais: probióticos. In: PORTUGAL, J. A. B.; CASTRO, M. C. D.; SILVA, P. H. F. O Agronegócio do Leite e os Alimentos Lácteos Funcionais. Juiz de Fora: **EPAMIG – Centro Tecnológico – ILCT**, 2001. p. 183-203, 2001.

FREITAS, F. F. Otimização do Processo de Imobilização de β – Galactosidase de *Aspergillusoryzae* em Alginato de sódio com gelatina e glutaraldeído(**Tese de Doutorado**) Universidade Federal de Uberlândia, 2007.

GISIGER, A. Probióticos: Contribuições Para a Saúde da Gestante e do Neonato (**Trabalho de Conclusão de Curso**), Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Ciências Aplicadas, 2015.

GROBOILLOT, A.; BOADI, D. K.; PONCELET, D.; NEUFELD, R. J. Immobilization of cells for application in the food industry. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 14, n.2, p. 75-107, 1994.

HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, M. J. H. Probiotics: a general view. In: WOOD, B.J.B. Lactic acid bacteria in health and disease 1. **Elsevier Applied Science**. v.1, n.1, p.151- 170, 1992.

HOMAYOUNI A.; AZIZ A.; EHSANI M. R.; YARMAND M. S.; RAZAVI S. H.. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of symbiotic ice cream. **FoodChemistry**, v. 111, n.1, p.50-55, 2008.

KITAMURA, D. H. Produção de Biomassa Probiótica e Enriquecida com Selênio de *Saccharomycesboulardii* Utilizando Melaço de Cana-de-açúcar. (**Dissertação de Mestrado**). Universidade Federal do Paraná, 2013.

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

LOPES, T. R.; PINTO, M. A. O. Aplicação terapêutica de *Saccharomycesboulardii* em diarreias: uma revisão. **HU Revista**, v. 36, n. 2, p. 107-122, 2010.

LORENZ, J. G. Comparação dos métodos de emulsificação e spray drying de *Lactobacillusaciophilus* (LA-5) e aplicação em sorvete. (**Dissertação de mestrado**). Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

MACEDO, L. N. et al. Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 935-942, 2008.

MARTINS, F. D.; BARBOSA, F. H. F.; NICOLI, J. R. O probiótico *Saccharomycesboulardii*. **Revista de Biologia e Ciências da Terra.**, v. 9, n.2. 2009.

MESQUITA, R. A. Imobilização de *Xanthomonascampestris* Com Síntese bb9 Simultâneade Poliuretano para Produção de Goma Xantana(**Tese de Pós-**

graduação). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - Departamento de Ciências Agrárias, 2018.

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

ORTIZ, S. Imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em Alginato de Cálcio com Nanopartículas Magnéticas. **(Tese de Pós-graduação)**. Universidade Federal de Santa Catarina - Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, 2017.

PEDROSO, S. H. S. P. Ação Probiótica da Levedura *Saccharomyces boulardii*. **(Monografia)**. Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas, 2011.

PIMENTEL, T. C. Probióticos e Benefícios à Saúde. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 1, p. 101-107, 2011.

REGINATO, A. et al. Avaliação da viabilidade de células livres e microencapsuladas de Probióticos em alíquotas congeladas e diferentes produtos funcionais. **FCA/ Instituto de Tecnologia de Alimentos**. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, 2011.

ROY, I.; GUPTA, M. N. Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase: entrapped individually in calcium alginate beads. **Enzyme and Microbial Technology**, v.34, n.1, p. 26-32, 2004.

SHAH, N. P. Functional foods from probiotics and prebiotics. **Food Technology**, v. 55, n. 11, p. 46-52, 2001.

SILVA, S. V. Desenvolvimento de iogurte probiótico com prebiótico **(Dissertação de Mestrado)** - Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

SOUZA JUNIOR, W. C. Imobilização de Células Permeabilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 em Alginato de Cálcio e sua Aplicação na Hidrólise de Galactoligossacarídeos. **(Dissertação de Pós-graduação)**. Universidade Federal de Viçosa, 2006.

TAMPION, J.; TAMPION, M. D. Immobilized cells: principles and applications. **Cambridge University Press**. 275p., 1988.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescida de prebiótico. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 26, n.1, p. 589-595, 2006.

WENDLING, L. K.; WESCHENFELDER, S. Probióticos e alimentos lácteos fermentados - uma revisão. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 68, n. 395, p. 49-57, 2013.