



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**Estudo da estabilidade de formulações sólidas de
probióticos de *Lactobacillus acidophilus* para alimentação
animal**

Soraya Rodrigues Ferreira

Uberlândia – MG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



Estudo da estabilidade de formulações sólidas de probióticos de *Lactobacillus acidophilus* para alimentação animal

Soraya Rodrigues Ferreira

Orientador:

Dr. Ubirajara Coutinho Filho

Dra. Vicelma Luiz Cardoso

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Uberlândia – MG

2011

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE SORAYA RODRIGUES FERREIRA
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
ENGENHARIA QUÍMICA, EM 26/08/2011.**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
Orientador – (FEQUI/UFU)

Prof.^a. Dr.^a. Vicelma Luís Cardoso
Co - Orientadora (FEQUI/UFU)

Prof. Dr.^a Patrícia Angélica Vieira
(FEQUI/UFU)

Prof.^a. Dr. Marcos Antonio de Souza Barroso
(FEQUI/UFU)

Prof. Dr. Rodrigo de Oliveira Moraes
(Diretor – Fundação André Toselho)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG - Brasil

F383e Ferreira, Soraya Rodrigues. 1979-
 Estudo da estabilidade de formulações sólidas de probióticos de
Lactocacillus acidophilus para alimentação animal / Soraya Rodrigues
Ferreira. – 2011.

103 f. : il.

Orientadores: Ubirajara Coutinho Filho e Vicelma Luiz Cardoso.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
Inclui bibliografia.

1. Engenharia química – Teses. 2. Probióticos – Teses.
3. *Lactobacillus acidophilus* – Teses. I. Coutinho Filho, Ubirajara. II. Cardoso, Vicelma Luiz. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDU: 66.0

A Deus,

“A ti, Senhor, agradeço pela sabedoria que me concedeu durante esse tempo. Sou grata pela Tua presença que me deu força para resistir às dificuldades e alcançar mais uma vitória”.

Dedico este trabalho

Principalmente a Deus por me dar saúde, forças, fé e coragem para buscar meus objetivos e concluir mais esta etapa da minha vida.

E fundamentalmente aos meus pais, Antônio e Lazara, ao meu amor Antônio, as minhas irmãs Mauritândia, Juliana e Hosana, cunhados Wesley, Alexandre e Victor Hugo, e aos meus sobrinhos Gabriela e Frederico pelo amor e confiança durante a realização deste trabalho, apoio e incentivo que sempre recebi. Sem vocês eu não sou nada. Vocês são a base da minha existência. Muito obrigada!

Agradecimentos

Estou chegando ao fim de mais uma etapa em minha vida, foram momentos custosos, mas também de muitas alegrias, descobertas e muito aprendizado. Durante todo esse trajeto muitas pessoas estiveram à minha volta, me apoiando, animando, ensinando e, quando necessário fazendo críticas construtivas. A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que eu conseguisse chegar ao fim dessa jornada, espero não me esquecer de citar algum amigo, aproveito esta ocasião para formalmente expressar meus sinceros e profundos agradecimentos.

A realização de uma dissertação de mestrado constitui-se uma tarefa de tal magnitude, que se torna impossível realizá-la sem a ajuda de outras pessoas e gostaria de certificar que as mesmas soubessem de meu apreço.

A Deus, pelo privilégio de nascer num lar cristão, por ser uma luz constante aos meus pés, guiando meus caminhos, por ter me dado forças para alcançar mais uma vitória. Por fazer de mim testemunha de toda a grandeza e de todo o amor que ele representa. Obrigada Senhor por abrir “portas” nos momentos em que eu mais precisei, por colocar pessoas amigas e benevolentes em meu caminho, por me levantar quando pensei não ter mais forças para seguir em frente, por me ajudar a superar todas as dificuldades do dia-a-dia e conseguir alcançar os meus objetivos. Obrigada por eu ser tão abençoada!

Aos meus pais, Antônio e Lazara, pelo amor incondicional, pela criação e dedicação, pelo exemplo de trabalho, humildade e honestidade, por tantos sacrifícios em meu favor, por sempre acreditarem em mim e em meus sonhos. Que me ensinaram a ser quem eu sou, os quais demonstram com seus exemplos, como diferenciar o certo do errado. Obrigada pelo amor, apoio e incentivo. Obrigada pela dedicação, pela amizade, pelo companheirismo. Obrigada pelas mãos entrelaçadas na minha, doando-me confiança, na certeza de estar indo por caminhos seguros e na certeza de que terei sempre onde amparar caso eu tropece. Por estarem presentes em todos os momentos de derrotas e vitórias, de tristezas e alegrias, de receios e superações, além de me darem suporte para chegar até aqui e vencer mais uma etapa da minha vida! Por me ensinarem que na vida é preciso

lutar muito e que apesar dos tropeços constantes no final de cada jornada há uma recompensa maravilhosa. Amo muito vocês!

Ao meu esposo Antônio, pelo amor e companheirismo, pelo apoio e compreensão, por estar sempre ao meu lado, por ser um exemplo de esforço, dedicação e disciplina.

Às minhas queridas irmãs, Maurítânia, Juliana e Hosana, pelo amor, pelos momentos de alegria e amizade, por me fazerem tão feliz e realizada como irmã.

À minha família que sempre esteve do meu lado, apoiando minhas decisões, mesmo quando eu mesma não sabia qual decisão tomar! Ao seu apoio incondicional... Muito obrigada!

Ao meu orientador Prof. Ubirajara Coutinho Filho, que com sua tranquilidade, atenção e importante contribuição foi alicerce imprescindível neste trabalho, por ter sempre me ajudado. Pelo voto de confiança em me orientar, pela dedicação, pelos ensinamentos, não só científico e profissional, mas também pela contribuição para meu amadurecimento pessoal e profissional. É um profissional com aptidão técnica inquestionável, que alia assistência humanizada, sendo este seu grande diferencial. Obrigada por ter-me concedido a oportunidade de realizar este sonho...

Às alunas de iniciação científica Natália Mazzarioli, Verônica dos Santos e Tais Magalhães por terem dedicado tanto tempo a este trabalho e por alegrarem nosso ambiente de trabalho. Minha sincera muito obrigada pela amizade adquirida ao longo destes anos, e sucesso na carreira futura.

A todos os professores da FEQUI que contribuíram direta ou indiretamente em minha formação.

Aos funcionários da FEQUI: Silvino Corrêa, José Henrique e Cecilia pela eficiência e por estarem sempre prontos a ajudar.

Às funcionárias Ione e Lúcia pelo auxílio no laboratório.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal pela oportunidade concedida.

A todos os funcionários da biblioteca, pela atenção e ajuda.

Aos membros da banca examinadora, pela relevante contribuição acadêmica e científica prestada a essa dissertação, pelas correções e sugestões.

Aos amigos inesquecíveis que fiz durante essa jornada, que estiveram presentes em momentos de alegria e satisfação.

A todos que fazem parte da minha vida, fundamentais sem exceção, cada qual à sua maneira, por perto ou distantes fisicamente, por acreditarem em mim, pelo afeto, enriquecimento moral, intelectual e espiritual, além da imensa diversão que me proporcionam. O que sou também é um pouco de cada um de vocês!

Passados mais de dois anos desde o início desse trabalho, muitas são as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para sua realização. A todas elas minha muito obrigada.

Enfim, agradeço a todos vocês que direta ou indiretamente participaram deste trabalho, todos merecem o meu agradecimento talvez apenas por uma palavra dita no momento em que eu precisava ouvi-la, apenas por um sorriso confortante pelos corredores, apenas por um abraço sincero, por um “puxão de orelha” para fazer o que é certo; também merecem o meu agradecimento aqueles que, distantes, pediram a Deus por mim e torceram para que tudo desse certo, para que eu suportasse e superasse as dificuldades. E graças a Deus e à ajuda de muitos, alcancei mais uma vitória em minha vida!

Eu sou uma pessoa abençoada por Deus! A concretização do mestrado é mais uma prova disso!

Muito Obrigada a todos!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE SIMBOLOS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
 CAPITULO 1- INTRODUÇÃO	 03
 CAPITULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	 06
2.1 – Probióticos	06
2.1.1 <u>Definição</u>	06
2.1.2 <u>Importância dos probióticos</u>	07
2.1.3 <u>Características</u>	08
2.1.4 <u>Bactérias Ácidas Lácticas (BAL)</u>	10
2.1.4.1 – Gênero Lactobacillus	10
2.2 – Imobilização celular e produção de formulações sólidas	12
2.2.1- <u>Suportes para imobilização célula</u>	14
2.2.2 - <u>Alginato</u>	15
2.2.3- <u>Gerador de formulações sólidas por secagem</u>	19
2.3 – Ceras	23
2.3.1 – <u>Introdução</u>	23
2.3.2- <u>Cera na apicultura</u>	23
2.3.3 - <u>Cera de Abelha</u>	24
2.3.3.1 – <i>Histórico da Cera de abelha</i>	24
2.3.3.2 – <i>Como é produzida?</i>	25
2.3.3.3 - <i>Composição química</i>	26
2.4 – Creme de leite	27
2.5 - Fatores que interferem no metabolismo dos micro-organismos	28
2.5.1 – <u>Fatores Intrínsecos</u>	29

2.5.1.1 – Atividade de água (A_w)	29
2.5.1.2 – Valor pH	32
2.5.2 – Fatores Extrínsecos	33
2.5.2.1 – Temperatura	33
2.5.2.2 – Umidade relativa do ar	33
2.6 – Antioxidantes	33
2.6.1 – <u>Ácido Ascórbico (Vitamina C)</u>	34
2.7 – Espessantes	35
2.7.1 – <u>Hidrocolóides</u>	36
2.7.2 – <u>Classificação dos Hidrocolóides</u>	37
2.7.2.1 – Carboximetilcelulose (CMC)	38
2.7.2.2 – Amido	39
2.7.2.3 – Goma Xantana	41
2.8 – Análise de sobrevivência dos micro-organismos	43
2.8.1 – <u>Introdução</u>	43
2.8.2 – <u>Funções de Sobrevivência, risco e função densidade de probabilidade</u>	44
2.8.3 – <u>Análise de Sobrevivência segundo modelos paramétricos</u>	45
2.8.4 - <u>Análise de Sobrevivência segundo modelos não paramétricos</u>	46
2.9 – Distribuição de Weibull	47
 CAPITULO 3- MATERIAL E MÉTODOS	 50
3.1 – Materiais	50
3.2. Métodos	50
3.2.1 <u>Preparo das culturas lácticas</u>	50
3.2.1.1 <u>Preparo da Fermentação</u>	51
3.2.1.2 <u>Plaqueamento</u>	51
3.2.2 – <u>Formulação sólida utilizadas</u>	51
3.2.3 – <u>Preparo das formulações utilizando alginato e creme de leite</u>	53
3.2.4 - <u>Preparo das formulações utilizando cera de abelha e composto de cera</u>	54
3.2.5 – <u>Condições de fermentação</u>	54
3.2.5.1- <u>Pré- Inóculo</u>	54
3.2.5.2 – <u>Fermentação meio MRS</u>	55
3.2.5.3 – <u>Fermentação meio leite padronizado</u>	55
3.2.6 – <u>Viabilidade dos micro-organismos</u>	56

3.2.7- <u>Determinação de umidade das amostras</u>	57
3.2.8- <u>Estudo da secagem das amostras</u>	58
3.2.9 – <u>Estudo do crescimento de fungos, alteração de cor e aparência</u>	58
3.2.10 – <u>Estudo da Análise de Sobrevivência</u>	58
3.2.11 – <u>Estudo da Atividade de Água (Aw)</u>	58
 CAPITULO 4- RESULTADO E DISCURSSÃO	59
4.1 – Descrição da fermentação	59
4.2 – Formulação de Alginato e Creme	60
4.3 – Formulações de Cera de Abelha e Composto de Cera	66
4.4 – Análise de sobrevivência	70
4.5 – Investigação da estabilidade	73
4.6 - Avaliação completas	76
 CAPITULO 5 – CONCLUSÃO	80
 CAPITULO 6 - SUGESTÕES FUTURAS	81
 CAPITULO 7 – APÊNDICE	82
Apêndice A	82
Apêndice B	84
 CAPITULO 8 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.1 - Fluxograma de estrutura do trabalho	05
Fig. 2.1 - Correlações entre bactérias intestinais e saúde humana. Esquema proposto por Mitsouka	08
Fig. 2.2 - Foto <i>Lactobacillus acidophilu</i>	11
Fig. 2.3 - Método de imobilização celular	13
Fig. 2.4 - Características e tipos de suporte utilizados nas diversas técnicas de imobilização	13
Fig. 2.5 - Método básico de imobilização	14
Fig. 2.6 - Foto de alga marrom	17
Fig. 2.7 - Estrutura dos blocos homopoliméricos M e G e dos blocos heteripoliméricos MG-, que constituem de alginato. Em (A) tem-se uma sequência M-M: em (B) uma sequência G-G e em (C) uma sequência M-G-M (LEONARD <i>et al.</i> , 2004)	17
Fig. 2.8 - Esquema da formação do gel de alginato de cálcio	18
Fig. 2.8 - Modelo da estrutura do gel de alginato de cálcio	18
Fig. 2.10 – Estados de umidade não ligada	20
Fig. 2.11 – Estrutura celular de uma célula procarionte	21
Fig. 2.12 – Estrutura celular de uma célula eucarionte	22
Fig. 2.13 – Principais etapas de processamento durante a desidratação dos micro-organismos e importantes fatores extrínsecos em cada etapa	22
Fig. 2.14 – Foto de cera de abelha	24
Fig. 2.15 – Abelha operária com a localização das glândulas secretora de cera	25
Fig. 2.16 – Mapa das transformações de alimentos em função da atividade de água	31
Fig. 2.17 – Fórmula química da Vitamina C	35
Fig. 2.18 – Molécula da Carboximetilcelulose (CMC)	39
Fig. 2.19 – Estrutura da amilase	40
Fig. 2.20 – Estrutura da amilopectina	40
Fig. 2.21 – Estrutura molecular da goma xantana	42
Fig. 2.22 - Taxa de falha descrita pelo modelo de Weibull	48
Fig. 2.23 – Função densidade na distribuição de Weibull para vários parâmetros de formulações β	48

Fig. 3.1 - Fluxograma do tratamento para obtenção de células imobilizadas	57
Fig. 4.1 – Crescimento celular na fermentação de leite e MRS	59
Fig. 4.2 - Umidade antes da secagem	61
Fig. 4.3 - Umidade após a secagem	61
Fig. 4.4 – Resultado experimental das contagens para diferentes formulações de alginato e creme	62
Fig. 4.5 – Resultado experimental das contagens para diferentes formulações de alginato e creme com o tempo	63
Fig. 4.6 – Tempo utilizado nas contagens para diferentes formulações de alginato e creme .	63
Fig. 4.7 – Resultado do valor predito e do valor calculado das formulações de alginato e creme	65
Fig. 4.8 – Resíduos associado aos ajustes das formulações de alginato e creme	65
Fig. 4.9 – Foto das células imobilizadas com e sem ácido ascórbico	66
Fig. 4.10 – Resultado experimental das contagens para diferentes formulações de cera de abelha e composto de cera	68
Fig. 4.11 – Tempo utilizado nas contagens para diferentes formulações de cera de abelha e composto de cera	68
Fig. 4.12 – Resultado experimental das contagens para diferentes formulações de cera de abelha e composto de cera com o tempo	69
Fig. 4.13 – Resultado do valor predito e do valor calculado das formulações de cera de abelha e composto de cera	69
Fig. 4.14 – Resíduos associado aos ajustes das formulações de cera de abelha e composto de cera	70
Fig. 4.15 – Curva de frequência de morte das formulações de alginato e creme	72
Fig. 4.16 – Curva de frequência de morte de todas as formulações	72
Fig. 4.17 – Comportamento da atividade de água (A_w) de todas as formulações	75
Fig. 4.18 – Umidade base seca das formulações com alginato e creme	75
Fig. 4.19 – Comparação dos Valores D de todas as formulações	77
Fig. 4.20 – Simulação da morte celular prevista pelos modelos ajustada para as melhores formulações de alginato, cera de abelha e leite	69
Fig. 4.21 – Comparação entre K_w e Valor D nas formulações de alginato e creme	79
Fig. 4.22 – Comparação entre A_w e Valor D em todas as formulações	79

LISTA DE TABELAS

Tab. 2.1. - Efeitos benéficos e aplicações terapêuticas atribuídas às bactérias probióticas em humanos ¹ . Alguns critérios de seleção de micro-organismos probióticos ²	09
Tab. 2.2 – Tipo de suportes mais utilizados na imobilização de micro-organismos, adaptado de Kolot	15
Tab. 2.3– Composição média da cera de abelhas	26
Tab. 2.4 - Especificações físico-químicas e organolépticas da cera clarificada de abelhas	27
Tab. 2.5 – Valores mínimos de Aw que permitem a multiplicação de micro-organismos que alteram os alimentos	30
Tab. 2.6 – Valores de pH ótimo para o crescimento de cada microrganismos	32
Tab. 2.7 – Informações sobre a carboximetilcelulose	39
Tab. 2.8 – Análise Sobrevivência	43
Tab. 2.9 – Modelo paramétrico de Análise de Sobrevivência	46
Tab. 2.10 – Comportamento das funções de sobrevivência de probabilidade taxa de falha ...	49
 Tab. 3.1 - Composição do meio de cultura Caldo MRS	 51
Tab. 3.2 - Composição do meio de cultura Agar MRS	51
Tab. 3.3 - Composição das formulações utilizadas nas preparações sólidas para 100 mL de água destilada	52
Tab. 3.4 - Composição das formulações utilizadas nas preparações sólidas para 30 gramas .	53
 Tab. 4.1 – Características de fermentação do meio MRS e do leite	 60
Tab. 4.2 - Parâmetros Cinéticos, coeficiente de correlação e Valor D das formulações	64
Tab. 4.3 - Parâmetros Cinéticos, coeficiente de correlação e Valor D das formulações com cera de abelha e composto de cera	67
Tab. 4.4 – Parâmetros ajustados pelo modelo de Weibull	71
Tab. 4.5 – Crescimento de fungos	73
Tab. 4.6 – Alteração de cor	74
Tab. 4.7 – Descrição da secagem nas formulações de alginato e creme	76

LISTA DE SIMBOLOS

$A(t)$ – Risco acumulado

d – Morte ou perda das características no ajuste não paramétrico

D – Valor D – Tempo necessário para redução decimal da concentração celular previsto no modelo de primeira ordem ou morte de 90 % das células (h)

$F(t)$ – Função densidade de tempo de vida

$f(t)$ – Função acumulada de tempo de vida

G – Parâmetro adicional de tempo de garantia

$h(t)$ – Função de risco

K - Constante cinética do modelo de primeira ordem de morte celular (h^{-1})

k_w - Constante de perda de peso (h^{-1})

n – População

$N_0(t)$ – Número de vivos inicial no tempo

$N(t)$ – Número de vivos no tempo

p – nível de significância

$S(t)$ Função de sobrevivência ou estabilidade estatística

t – Tempo (h)

t - Valor t-student

T – Tempo de meia vida (h)

U_0 – Umidade inicial (% massa água/ massa inicial e Kg H_2O / Kg seco)

U - Umidade final (% massa água/ massa inicial e Kg H_2O / Kg seco)

γ - Parâmetro de forma

λ – Parâmetro de escolha

RESUMO

Pela abundância de recursos e devido aos grandes avanços tecnológicos alcançados nos últimos anos em nutrição, manejo e genético animal, o Brasil se destaca como um dos principais produtores mundiais de alimentos de origem animal. Entretanto, apesar da evolução no manejo sanitário, a criação destes animais não está livre de micro-organismos patogênicos, que resultam em vários problemas relacionados aos distúrbios gastroentéricos, com impacto no aproveitamento de nutrientes e possibilidade de ocorrência de outras enfermidades. Neste contexto, o uso de antimicrobianos em doses subterapêuticas, como promotores de crescimento a fim de melhorar taxas de crescimento, eficiência alimentar, queda da mortalidade e morbidade devido a infecções clínicas e subclínicas, é bastante preocupante tanto pelo possível desenvolvimento de resistência bacteriana a antibióticos quando pelo próprio questionamento da segurança que esta prática oferece pela ação tóxica associada a outros compostos. Diante deste questionamento e pela busca de alternativas, o mercado cada vez investe mais no uso de micro - organismos vivos na forma de produtos probióticos que sejam capazes de agir de forma benéfica melhorando o equilíbrio intestinal do animal hospedeiro. Para que estes produtos probióticos possam fornecer aos hospedeiros esta ação benéfica os mesmos precisam ser estáveis tanto durante o preparo quanto no armazenamento. Pelo interesse que há nesta classe de produtos, o objetivo do presente trabalho foi avaliar formas distintas de produção de formulações probióticas sólidas e estudar a estabilidade destas formulações. Foram preparados e estudados três tipos de formulações: formulações secas de alginato, formulações secas de creme e formulações contendo cera de abelhas. Neste trabalho foi avaliadas formulações probióticas sólidas preparadas pelo uso de alginato, creme de leite e cera de abelha em termos da cinética de morte celular, análise estatística da sobrevivência e avaliações da atividade de água, umidade e crescimentos de fungos no produto. A comparação entre as formulações mostrou que as formulações de alginato, creme e cera foram mais estáveis que as células secas e que entre todas as formulações testadas aquelas que utilizaram cera de abelha em sua composição foram as mais estáveis. A avaliação comparativa entre as formulações mostrou que: a) as formulações de alginato foram mais estáveis que as formulações de creme; b) o uso de ácido ascórbico como aditivo reduziu a estabilidade das formulações de alginato e creme; c) a viabilidade inicial das diferentes formulações não é capaz de explicar a estabilidade das mesmas; d) a baixa atividade de água explica parcialmente a estabilidade das formulações; e) as condições de

secagem utilizadas foram adequadas para gerar as diferentes formulações. A análise de sobrevivência pelo modelo de Weibull mostrou que em nenhuma das condições testadas houve um efeito protetivo associado aos aditivos testados.

Palavras-chave: *Lactobacillus acidophilus* LA 5, probióticos , estabilidade celular, formulações sólidas de probióticos.

ABSTRACT

Due to the abundance of agricultural resources, *last advances in* animal nutrition, *animal* breeding and animal welfare there are a solid background in economics and management in Brazilian *Animal agribusiness*. *Nevertheless, the sanitary* improvements in animal breeding they are exposed to pathogenic microorganism *responsible for gastrointestinal infections* and others disturbs. In this context, *antimicrobial agents are used therapeutically, prophylactically, and as growth promoters*. But they can be *the cause of* health risks due to *the development* of antibiotic resistance and can be toxic to humans if improperly applied, so this use remains a source of *deep concern and the replace of antimicrobial agents by* probiotics are becoming very commonly. *This work is motivated by the fact that the guarantee* of the viability and *stability of* probiotic foods during the production and shelf-life is a technological challenge. *In this dissertation were studied* the stability of three kinds of solid state probiotic: alginate, milk cream and beeswax formulations. *According to the results* all formulations demonstrated *better stability* than dried cells and cells dried with nutrient *media composed of fermented milk and beeswax formulations presented the better stability*. The comparison between the formulations in three solid bases shows that: a) alginate formulations have better stability than milk cream formulations; b) ascorbic acid reduced the stability of formulations containing milk cream and alginate; c) the initial cell viability was not responsible for the observed stability; d) the formulation stability is partially correlated to low water activity; e) the *conditions used to dry* the formulations provide high initial cell viability. The survival analysis in accordance with the *Weibull distribution* show solid preparations tested have *no protective effect* related to tested additives.

Key-words: *Lactobacillos acidophilus LA 5*, probiotic, solid state probiotic formulations, cellular stability

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A atividade suinícola no Brasil vem demonstrando um perfil bastante definido, por ampliar as conquistas no mercado externo, destacando-se no agronegócio. Em 2000, o Brasil exportou 127.883 toneladas de carne suína, e entre junho de 2006 a maio de 2007, alcançou a cifra de 584.185 toneladas, registrando um aumento de 456,81% nos últimos sete anos, segundo a Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína (ABIEPCS, 2011). Além do mercado externo, o consumo per capita da carne suína no Brasil também mostrou aumento significativo de 7,05 kg/habitante. ano, em 1990, para os atuais 12,6 kg/habitante.ano (ABCS, 2011).

Este crescimento da suinocultura brasileira deve-se principalmente aos grandes avanços tecnológicos alcançados nos últimos anos, seja em nutrição, manejo ou genética. Entretanto, apesar da evolução no manejo sanitário, as granjas não estão livres de micro-organismos patogênicos, que resultam em vários problemas relacionados aos distúrbios gastroentéricos, com impacto no aproveitamento de nutrientes e possibilidade de ocorrência de outras enfermidades correlacionadas (CHIQUEIRI, 2003).

Antimicrobianos vêm sendo utilizados há mais de 50 anos em doses subterapêuticas, como promotores de crescimento (FEDALTO *et al.*, 2002), a fim de melhorar as taxas de crescimento e a eficiência alimentar, e diminuiu a da mortalidade e a morbidade devido a infecções clínicas e subclínicas em criações intensivas (COSTA, 2005).

Atualmente, a adição de antibióticos na dieta é bastante preocupante, pelo possível desenvolvimento de resistência bacteriana a alguns deles, que são utilizados na linha humana e da mesma forma, existe o temor de que essa resistência provoque o desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos administrados aos suínos no decorrer da cadeia produtiva (LIMA, 1999).

A pressão para a remoção de antimicrobianos das rações tem aumentado a busca por produtos alternativos. Entre esses, são destacados os probióticos (micro-organismos vivos que ao serem agregados como componentes da dieta exercem ação benéfica na flora intestinal microbiana tanto em animais como em humanos (GUEIMONDE *et al.*, 2006; REIG, ANESTO, 2002; ROOS, KATAN, 2000; KERN, 2002)) e os prebióticos (ingredientes não digeríveis incorporados aos alimentos com a finalidade de estimular o crescimento e/ou atividade de determinadas bactérias da microbiota intestinal (ZIEMER e GIBSON, 1998; LEE

et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2002)), com potencial para trazer benefícios à saúde dos animais domésticos (KAMIMURA, 2006). Além disso, os simbióticos, que são produtos contendo o probiótico junto ao prebiótico, também estão sendo utilizados na produção animal (CARAMORI JÚNIOR, 2001).

Uma das vantagens da utilização dos produtos supracitados, como promotores de crescimento, é a ausência da resistência bacteriana, o que representa aspecto importante em relação aos riscos de saúde pública e segurança dos produtos (SANCHES, 2004).

Quanto aos probióticos, o principal modo de ação parece ser a exclusão competitiva, exigindo, todavia, a necessidade da administração continuada e de elevadas doses para manifestar seus efeitos. Os probióticos podem também afetar patógenos através da síntese de bacteriocinas (NAIDU *et al.*, 1999), de ácidos orgânicos voláteis (JIN *et al.*, 2000; OGAWA *et al.*, 2001) e de peróxido de hidrogênio (NAIDU *et al.*, 1999), ou atuar sobre o metabolismo celular, reduzindo a concentração de amônia no organismo (KOZASA, 1986) e liberando enzimas como a lactase (DE VRESE *et al.*, 2001).

A maioria dos estudos demonstrou que bactérias ácido-lácticas, utilizadas como probióticos, têm efeito imunoestimulante em animais e no homem, apesar de ainda não estarem esclarecidos os mecanismos pelos quais isto ocorre (CROSS, 2002).

A tecnologia de imobilização microbiológica de células representa uma tendência nova em processos bioquímicos, e seu grande potencial está sendo reconhecido. Esta tecnologia é usada para produção de antibióticos, enzimas, álcool, produção ácida entre outros (PRADELLA, 2001).

A aplicação de bioprocessos fazendo uso de células imobilizadas em suportes tem sido objeto de estudo de diversas pesquisas em biotecnologia, por apresentarem uma série de vantagens, como permitir o uso de células por um tempo prolongado, levar à obtenção de maiores valores de conversão de substrato a produto, entre outras (PRADELLA, 2001).

As técnicas de imobilização de células têm sido aprimoradas e diversos suportes são utilizados, como polímeros sintéticos, gel de poliacrilamida, minerais (crisotila, alumina, terra diatomácea, rocha vulcânica, sílica porosa), polipropileno, resina epóxi, polissacarídeos naturais (alginato de sódio, k-carragena, pectina cítrica, Agar), vegetais (madeira, fibras de algodão, bagaço de cana), metais (aço inoxidável).

Dentre os métodos de imobilização utilizados nos diversos sistemas biológicos, o método por envolvimento em gel apresentou-se como um dos mais estudados na literatura, constituindo cerca de 80% dos trabalhos e, destes, 43% utilizavam o alginato como matriz de imobilização, de acordo com o levantamento realizado por Gerbesh (1995).

O aprisionamento de células em gel de alginato de sódio é a técnica mais amplamente utilizada para a imobilização de células viáveis. A gelificação do alginato ocorre rapidamente na presença de íons de cálcio sem alterações drásticas em temperatura, pH e pressão osmótica, o que permite preservar a atividade e a viabilidade dos micro-organismos imobilizados. Além disso, o alginato é um material barato e facilmente encontrado (BATISTA *et al.*, 1999).

O objetivo geral deste trabalho foi formular probióticos de *Lactobacilos acidophilus* na forma imobilizada para uso em ração de consumo animal. E os objetivos específicos foram: obter células de *Lactobacillus*, preparar probióticos com células imobilizadas e conduzir ensaios para caracterização das formulações produzidas.

Com a finalidade de obter preparações probióticas sólidas adequadas para o consumo animal a presente dissertação objetivou estudar a forma de retenção de células probióticas em material sólido. O presente trabalho foi estruturado de forma apresentado na Figura 1.1.

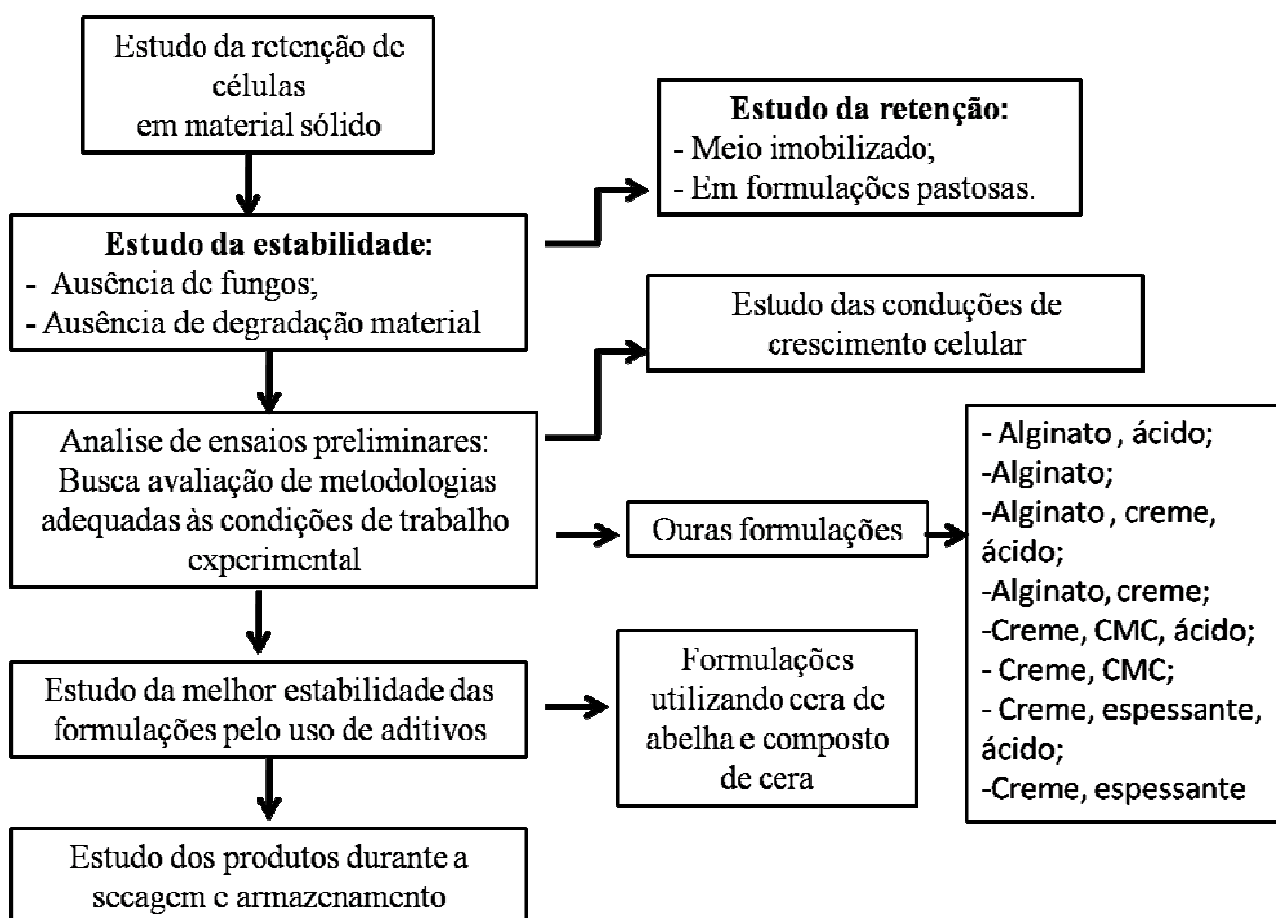


Fig. 1.1. - Fluxograma da estrutura do trabalho

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Probióticos

2.1.1 Definição

Determinados tipos de alimentos têm efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro. O estudo desses alimentos, denominados de funcionais, e seus componentes responsáveis por esse efeito, tornou-se intenso apenas nos últimos anos (OLIVEIRA, 2002). São considerados alimentos funcionais aqueles que fornecem a nutrição básica e a melhora da saúde por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional, devendo ser salientado, que esses efeitos restringem-se à melhora da saúde e não à cura de doenças (SANDERS, 1998).

Segundo Fooks *et al.* (1999), a palavra **probiótico** deriva de duas palavras gregas que significam 'por vida'. Parker (1974) *apud* Fooks (1999) foi o primeiro a usar a palavra probiótico no contexto de suplementação animal e foi definida como organismos e substâncias que contribuem para o balanço da flora intestinal.

Guarner & Schaafsman (1998) definiram os probióticos como sendo: “Micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos na saúde do indivíduo”.

Fuller (1989) *apud* Lourens-Hattingh e Viljoen (2001) e Salminen, *et al.* (1999) definiram os próbióticos como um suplemento alimentício de micro-organismos vivos que afeta de forma benéfica o animal hospedeiro pelo seu incremento no balanço da flora intestinal.

Os probióticos são “micro-organismos vivos que quando ingeridos agem de maneira benéfica, melhorando o equilíbrio intestinal do animal hospedeiro” (FULLER, 1994). As bactérias probióticas permanecem vivas no produto fermentado e sobrevivem à passagem pelo trato gastrointestinal, fixando-se no intestino (SEIBEL, 1998).

Os probióticos são ingredientes não digeríveis incorporados aos alimentos no sentido de selecionar determinadas bactérias da microbiota intestinal, por meio de sua atuação como substrato seletivo no cólon (ZIEMER e GIBSON, 1998; LEE *et al.*, 1999). A ação deste composto ocorre pela exclusão competitiva (OZAWA *et al.*, 1978), competição por: locais de adesão no aparelho digestivo (WATKINS e MILLER, 1983), estímulo da imunidade

(INOOKA *et al.*, 1986), maior produção de ácido láctico (FULLER, 1977), diminuição da produção de amins tóxicas e aumento da disponibilidade de aminoácidos nos locais de absorção (KOZASA, 1989), economia de energia e por aumento da disponibilidade de vitaminas e enzimas (FULLER, 1989). A ação benéfica do uso de probióticos ocorre de duas formas: determinando melhores índices zootécnicos com maior produtividade e aumento no ganho de peso e melhor conversão alimentar; e reduzindo a colonização intestinal por alguns patógenos, como por exemplo, as salmonelas.

Um micro-organismo probiótico deve atender a certas exigências que são: resistência ao ambiente ácido estomacal, à bile e às enzimas pancreáticas, adesão às células da mucosa intestinal, capacidade de colonização e produção de substâncias antimicrobianas contra as bactérias patogênicas (FOOKS *et. al.*, 1999).

Para garantir um efeito contínuo, os probióticos devem ser ingeridos diariamente (SAAD, 2006). Mudanças positivas na composição da microbiota intestinal foram observadas com doses de 100g de produto contendo 10^9 UFC de micro-organismos probióticos (10^7 UFC/g de produto), geralmente com a administração durante um período de 15 dias. Dessa forma, para apresentarem importância fisiológica ao consumidor, os probióticos devem atingir populações entre 10^8 e 10^9 UFC/ g na recomendação diária do produto pronto para consumo, conforme indicação do fabricante (SAAD, 2006; ANVISA, 2011).

Na produção de alimentos probióticos deve-se fazer uma seleção adequada de linhagens que mantenham sua viabilidade durante a elaboração e o armazenamento, sobrevivam à passagem pelo trato gastrointestinal e confirmem propriedades tecnológicas adequadas a esse produto (KOMATSU, *et al.*, 2008).

2.1.2 Importância dos probióticos

Em 1987, Mitsuoka propôs um esquema hipotético, no qual ilustra as interações entre as bactérias intestinais e a saúde humana (Figura 2.1). Entre as bactérias classificadas como benéficas estão as bifidobactérias e os lactobacilos. As maléficas são *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Proteus* e alguns tipos de *Bacteroides*.

Um dos principais usos de probióticos pela espécie humana tem sido o de adjunto dietético, para repor e/ou prevenir o desbalanceamento da microbiota intestinal. As principais espécies que têm sido empregadas para fins probióticos são bactérias do gênero *Lactobacillus* como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*. Linhagens de

Enterococcus e *Bacillus* têm também sido utilizadas na composição de alguns probióticos, além de *Bifidobacterium*. (FERREIRA *et al.* 2000)

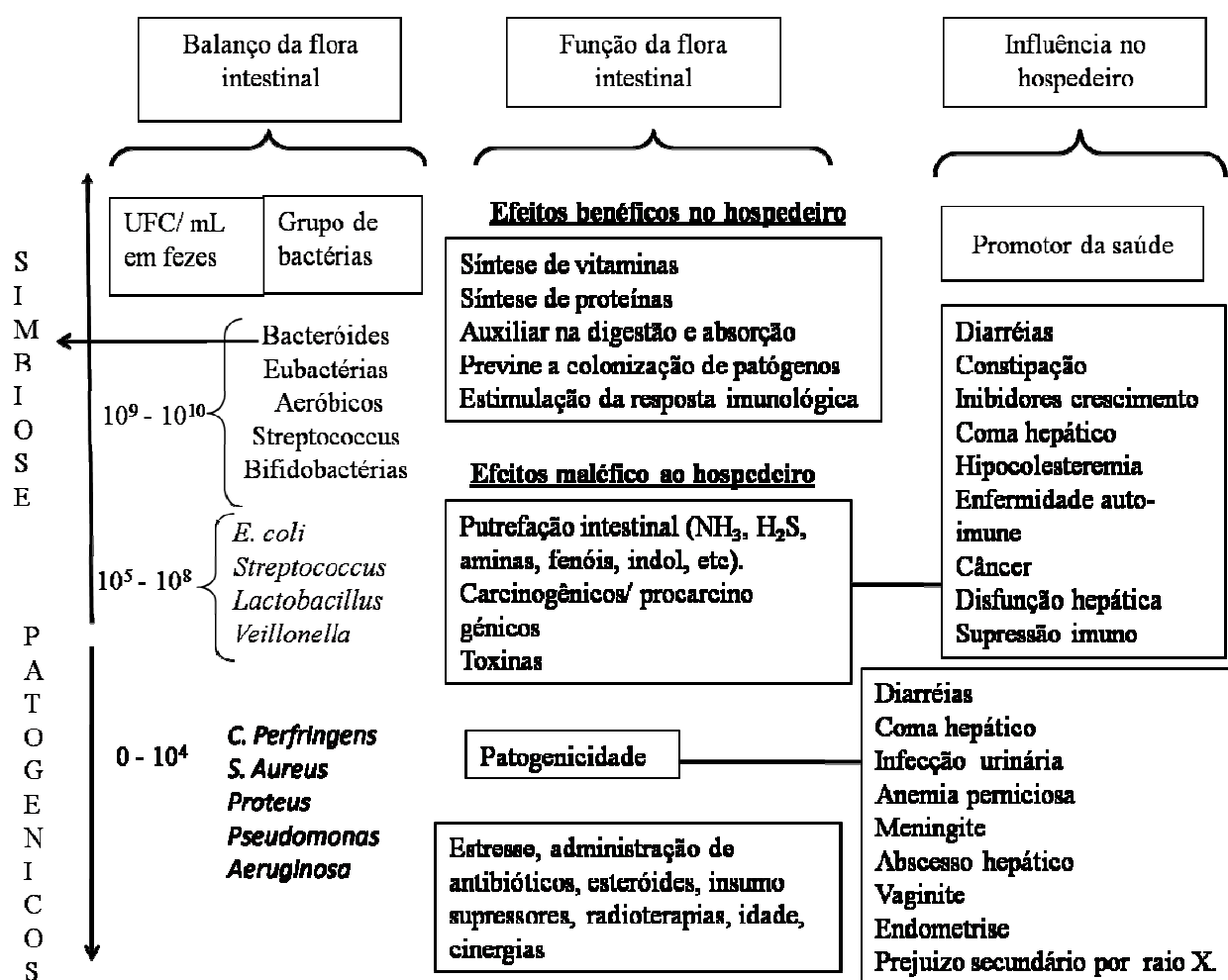


Fig. 2.1 - Correlações entre bactérias intestinais e saúde humana. Esquema proposto por Mitsouka (Laurens- Hattingh *et al.* 2001)

2.1.3 Característica

Para serem efetivos, os micro-organismos probióticos devem ser rigorosamente selecionados, pois existirão várias barreiras a ultrapassar até o lugar onde deverão atuar. Para uma bactéria ser probiótica, ela deve cumprir certos requisitos como os enumerados na Tabela 2.1.

Tab. 2.1. - Efeitos benéficos e aplicações terapêuticas atribuídas às bactérias probióticas em humanos¹. Alguns critérios de seleção de micro-organismos probióticos²

Efeitos benéficos	Alguns critérios para a seleção de micro-organismos probióticos
Manutenção da microflora intestinal normal Antagonista de crescimento de patogênicos Estimulação do sistema imunológico Redução da intolerância à lactose Redução dos níveis de colesterol Impedimento da reabsorção de compostos aaminados indesejáveis Desconjugação de doenças coronárias Atividade antimutagênica Atividade anticarcinogênica Atividade antitumorogênica Melhora o valor nutricional dos alimentos Efeitos nutricionais	1- Origem humana, 2- Resistências aos sucos gástricos, 3- Capacidades de aderência à mucosa intestinal, 4- Resistência à bÍlis, 5- Resistência à lisozima, 6- *Persistência no trato intestinal humano, 7- *Produção de substâncias antimicrobianas, 8- *Antagonistas de bactérias patogênicas e carcinogênicas, 9- *Seguros para uso clÍnicos e alimentÍcios, 10-Números elevados de micro-organismos probióticos, no momento de seu consumo, devendo para isto, resistir às condições de processamentos (desidratação, congelamento, liofilização), 11-*Validade clÍnica e com documentação dos efeitos à saúde.
Aplicações terapêuticas	
Prevenção de infecção urogenital Alívio da constipação Proteção contra diarreia dos viajantes Proteção contra a diarreia infantil Redução de diarreia induzida por antibióticos Prevenção de hipocolesterímia Prevenção contra câncer de colo e bexiga Prevenção da osteoporose	

¹Fuller, 1989, apud, Lourens-Hattingh *et al.* 2001. ²Fooks *et al.*, 1999 e Martin, 1996. *Saarela *et al.*, 2000.

2.1.4 Bactérias Ácido Lácticas (BAL)

As bactérias lácticas são bastante difundidas na natureza e capazes de se desenvolver sob diferentes condições ambientais. São associadas a ambientes ricos em nutrientes, sendo freqüentemente encontradas em alimentos fermentados, como leite, carnes, vegetais, grãos, frutas e bebidas. Algumas delas também fazem parte da microbiota natural dos tratos respiratório e intestinal e de cavidades naturais de humanos e animais (AXELSSON 1993). São amplamente utilizadas como fermentos lácticos devido à sua propriedade de conservar os alimentos e de fornecer uma proteção eficaz ao homem e a animais contra infecções intestinais (DELLAGLIO *et al.*, 1994).

As primeiras definições de bactérias lácticas, como um grupo, restringiram-se à capacidade que essas bactérias têm de coagular ou fermentar o leite. Assim, entre os micro-organismos lácticos constavam tanto *Lactobacillus* quanto *Escherichia*, separados posteriormente como Gram positivos e Gram negativos, por Beijerinck em 1901.

Todos os componentes do grupo láctico são fastidiosos e estão presentes em ambientes nutricionalmente ricos como vegetais, leite, carne e trato intestinal. São anaeróbios, anaeróbios facultativos ou microaerófilos (KIM e GILLILAND 1983; MARTEAU *et al.*, 1990a; IGARASHI *et al.*, 1994).

2.1.4.1 *Gênero Lactobacillus*

Lactobacilos são, em geral, caracterizados como Gram-positivos não formadores de esporos, não flagelados, homofermentativos e apresentam vias fermentativas de síntese de ácido láctico e acético, etanol e gás carbônico. Até o presente, 56 espécies do gênero *Lactobacillus* já foram identificadas. Destes micro-organismos, os mais comumente sugeridos para uso dietético são as linhagens de *L. acidophilus* (Figura 2.2), cuja definição foi alterada, recentemente, devido a reclassificações com base em técnicas genéticas de identificação (CHARTERIS *et al.*, 1997; GOMES e MALCATA, 1999).

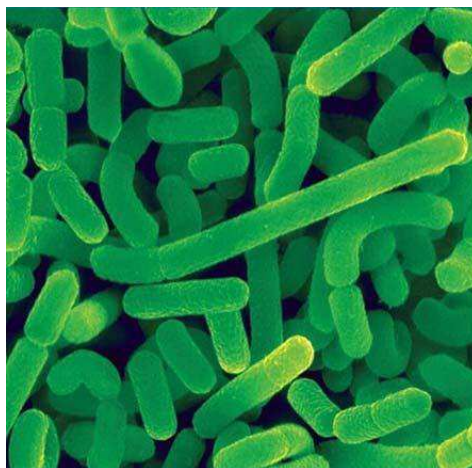


Figura 2.2 - Foto *Lactobacillus acidophilus*(www.login.medscape.com)

Segundo Itsaranuwat, Al-Haddad e Robinson (2003), o *L. acidophilus* é um habitante normal do final do intestino delgado e, neste lugar, as espécies ocupam o lúmen e aderem às superfícies da parede do intestino, realizando as seguintes ações:

- Secreta ácido láctico, que abaixa o pH do intestino e ajuda a inibir o desenvolvimento de patógenos invasivos como a *Salmonella* sp ou cepas de *Escherichia coli*;
- Compete com sucesso pelo espaço e nutrientes contra as mesmas espécies de bactérias patogênicas;
- Metaboliza a lactose residual, ajudando a diminuir o desconforto em consumidores com baixos níveis de lactase natural do intestino.

De acordo com o Bergey's Manual of Determinate Bacteriology, o gênero *Lactobacillus* é composto por bacilos Gram positivos, regulares e não esporulados. Possuem morfologia celular variando de bacilos longos e finos até, algumas vezes, como bacilos curvados e pequenos (KANDLER e WEISS 1986). Os *Lactobacillus* são microaerófilos (aerotolerantes) e quando em crescimento na superfície em meios sólidos, geralmente o desenvolvimento é melhor em anaerobiose ou pressão de oxigênio reduzido e 5% a 10% de CO₂; alguns são anaeróbios em isolamento.

Crescem em temperaturas que variam de 2°C a 53°C, com valores ótimos, geralmente, de 30°C a 40°C. São acidúricos, com pH ótimo entre 5,5 e 6,2; o crescimento ocorre a 5,0 ou menos. Sua tolerância à acidez varia de 0,3% a 1,9% (acidez titulável), com pH ótimo entre 5,5-6,0 (CHARTERIS *et al*, 1997; GOMES e MALCATA, 1999).

O *Lb. acidophilus*, por sua vez, cresce mesmo na presença de 0,5% de fenol e de 4% de sais biliares. Sendo o fenol um produto dos processos putrefativos do intestino grosso

(assim como o indol, escatol, etc), a resistência a este produto pode ser usada como um indicador da capacidade de sobrevivência no intestino de algumas bactérias (RASIC e KURMANN, 1978).

2.2 - Imobilizações celulares e produção de formulações sólidas

A utilização de células imobilizadas em processo de larga escala é bastante remota e, embora não fossem conhecidos, os princípios da imobilização já eram amplamente empregados na produção de ácido acético desde os primórdios do século XIX (PHILLIPS e POON, 1998).

Segundo Fan (1989), células imobilizadas podem ser definidas como “células que são fisicamente confinadas ou localizadas em uma região definida do espaço, com manutenção de sua atividade catalítica e/ou viabilidade, podendo ser usadas repetidas e continuamente”.

A imobilização de células consiste no confinamento físico destas numa região definida de espaço, com preservação de suas atividades catalíticas (KAREL *et al.*, 1985 apud WILLAERT, 1996). Esse confinamento é conseguido através do contato das células com algum material, chamado de suporte, sob condições ambientais controladas. Porém, também é possível trabalhar com células imobilizadas naturalmente, denominadas “*pellets*” naturais (SARRÀ *et al.*, 1996).

Este processo de imobilização impede a ação de enzimas, íons, pressão mecânica, pH extremos, calor e outros efeitos geradores de estresse físico e bioquímico para a célula, pois o suporte dificulta a ação direta dos efeitos do estresse na estrutura protéica de membranas celulares e também protege as células da contaminação por fungos e bactérias indesejáveis.

A classificação mais aceita para os métodos de imobilização, que vale para células e enzimas, divide as diferentes formas de imobilização em três tipos: adsorção, ligação covalente e envolvimento (PRADELLA, 2001). Porém alguns autores aceitam outro tipo de classificação: adsorção em suporte sólida; penetração em uma matriz porosa; auto-agregação por floculação (natural) ou com agentes de cross-link (induzida artificialmente) e células em barreiras (PILKINGTON *et al.*, 1998).

Wendhausen Junior, 1998 descreve os mais diversos métodos de imobilização de biocatalisadores que têm sido relatados na literatura, e encontram-se destacados na Figura 2.3.

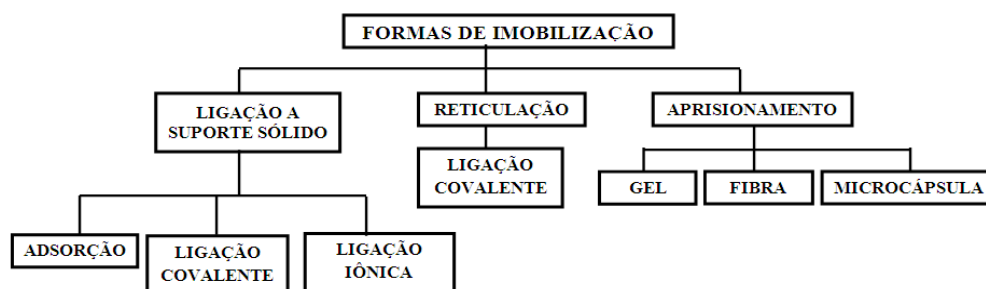


Fig. 2.3 - Método de imobilização celular (WENDHAUSEN JUNIOR, 1998)

As principais técnicas de imobilização propostas para micro-organismos podem ser divididas em duas categorias: ativas e passivas (ABBOT, 1997).

As técnicas ativas compreendem a aplicação de algum processo químico a fim de imobilizar as células. Pode-se citar as seguintes técnicas: tratamento prévio das células e utilização sem suporte, inclusão em gel, fixação em suporte sólido tanto por ligações covalentes como por adsorção em superfícies modificadas. O uso destas técnicas permite reduzir grandemente os custos de produção em relação aos processos com células livres (BLACK, 1983; JACK e ZAJIC, 1977).

As técnicas passivas promovem a formação espontânea de filmes ou flocos de micro-organismos uma vez que somente alguns micro-organismos têm a propriedade de formar filmes estáveis, como *Acetobacter* na produção de ácido acético, ou cultura mista no tratamento biológico de resíduos. Suportes comuns para essas cepas são materiais inorgânicos, serragem de madeira e material plástico (COOPER e WHEELDON, 1981).

Nas Figuras 2.4 e 2.5, pode-se observar os tipos de forças de atração e as diversas formas de imobilização.

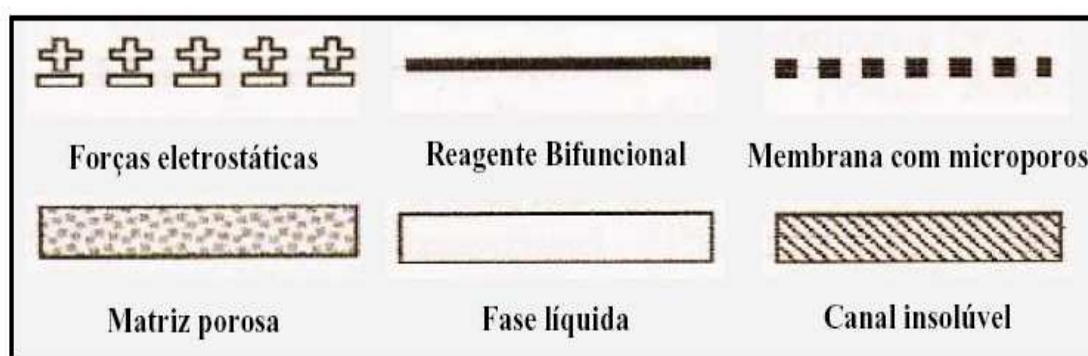


Fig. 2.4 - Características e tipos de suporte utilizados nas diversas técnicas de imobilização, (KOURKOUTAS *et al.*, 2004)

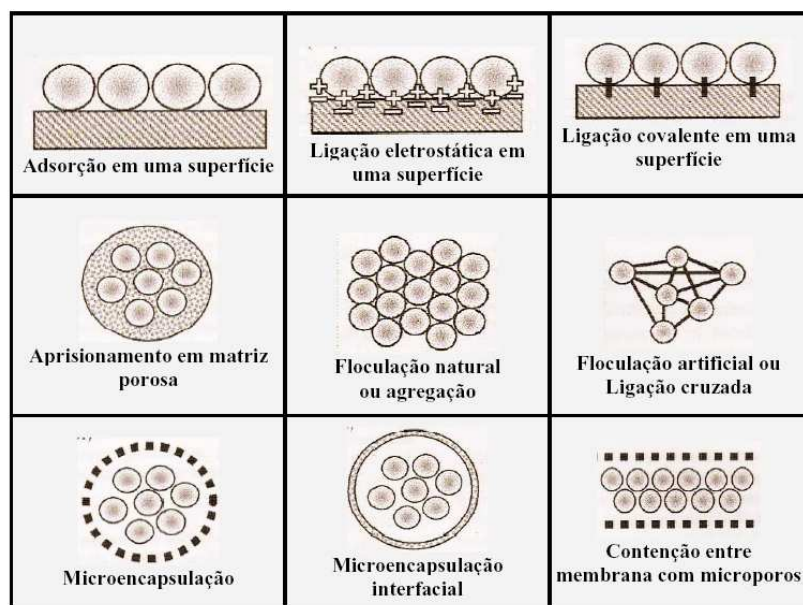


Fig. 2.5 - Método básico de imobilização (KOURKOUTAS *et al.*, 2004)

Kourkoutas *et al.* (2004) citado por Pantoja (2006) mencionam que as técnicas de imobilização podem ser divididas em quatro grupos (Figura 2.6), levando em consideração os mecanismos físicos presentes no processo:

- **Aprisionamento em matriz porosa:** é baseado na inclusão de células dentro de um retículo rígido prevenindo a difusão celular para o meio.
- **Junção ou absorção em superfície sólida:** é realizada por força eletrostática ou por ligação covalente entre a membrana das células e o carreador.
- **Retenção por barreiras:** consiste no uso de membranas microporosas, no aprisionamento de células em uma microcápsula ou ainda, na imobilização de células por uma interação superficial de dois líquidos imiscíveis.
- **Auto agregação por floculação ou com agente de ligação:** consiste em um agregado celular que forma uma unidade maior de células com propriedades de sedimentar rapidamente.

2.2.1- Suportes para imobilização celular

A literatura cita a utilização dos mais variados materiais na imobilização celular e, de forma geral, pode-se classificá-los em suportes inorgânicos e orgânicos. Na Tabela 2.2 adaptadas de Kolot, são mostradas os mais comumente utilizados, sendo que para alimentos, suportes como aço inoxidável, vidro e resina não são utilizados.

Tab. 2.2 – Tipo de suportes mais utilizados na imobilização de micro-organismos, adaptado de Kolot

Compostos Orgânicos			Compostos Inorgânicos
Polissacarídeos	Proteína	Polímeros sintéticos	
Alginato de sódio	Colágeno	Resina Fenólica*	Alumina*
β- Carregena	Gelatina	Poliestireno*	Sílica*
Pectina		Poliacrilamida*	Cerâmica*
Ágar		Cloreto de Polivinilha*	Vidro*
Celulose		Resina de troca Iônica*	Zircônia*
			Aço Inoxidável*

Nota: * Não utilizado na alimentação humana e animal

Vários suportes têm sido utilizados para a imobilização celular e alguns parâmetros devem ser considerados, quando da escolha de um dado material:

- Atoxicidade;
- Não exercer influência negativa no metabolismo celular;
- Elevada capacidade de retenção microbiana, de forma que se consiga altas concentrações de células no reator;
- Inércia química e bioquímica, para que não ocorra o ataque do micro-organismo imobilizado ou do meio onde o biocatalisador está imerso;
- Estabilidade na temperatura e no pH de operação;
- Alta difusividade de reagentes e produtos;
- Resistência mecânica adequada às necessidades do processo;
- Facilidade de conformação em tamanhos e formas específicas;
- Possibilidade de regeneração;
- Custo não muito elevado.

2.2.2 - Alginato

Dentre os diferentes métodos de imobilização de biocatalizadores discutidos em alguns trabalhos (SCOTT *et al.*, 1987; LEO *et al.*, 1990; SERP *et al.*, 2000), o método de envolvimento em gel é um dos mais utilizados para imobilização de células. O grande interesse nesse tipo de método de envolvimento é decorrente das suas vantagens, com destaque para fato de o biocatalisador não se encontrar ligado quimicamente à matriz,

permitindo assim, a imobilização de células microbianas de diferentes tamanhos sem diminuição da atividade biológica (KENNEDY; CABRAL, 1983).

Um dos processos de imobilização mais utilizado na produção de probióticos é a imobilização celular por encapsulação. Neste processo, macromoléculas, como hidrocolóides, geram uma estrutura tridimensional capaz de reter as células de interesse em um ambiente que as protege da ação do calor e outras condições adversas geradas durante o processamento dos alimentos ou no processo digestivo (RAYMENT *et al* 2009).

Dentre os suportes aplicados no método por envolvimento, o alginato de cálcio tem apresentado posição de destaque, pois tem sido referenciado como melhor opção dentre outros suportes, como visto nos trabalhos de VEELKEN e PAPE (1982), BEG, *et al.*, (2000) e SRIDEVI e SRIDHAR (2000).

Outro fator importante que viabiliza a utilização da técnica de imobilização em alginato é a possibilidade do preparo de grandes quantidades de *pellets* de maneira fácil e relativamente rápida (ORIVE *et al.*, 2002).

O alginato é um dos suportes mais utilizados para a imobilização de células microbianas inteiras por ser uma metodologia razoavelmente simples, além de ser uma técnica reprodutível que utiliza condições suaves durante o processo de imobilização. O alginato é um polissacarídeo encontrado em muitas espécies de algas marrons, entre elas a *Macrocystis pyrifera*. Os alginatos são heteropolímeros (Figura 2.7) lineares de ácidos carboxílicos compostos de subunidades monoméricas de β -D-ácido manurônico (M) e α -L-ácido gulurônico (G) interligados por ligações 1,4-glicosídicas (KAWAGUTI e SATO, 2008).

Quando as células são imobilizadas, o seu crescimento é afetado por fatores como o stress físico, limitações de nutrientes e acúmulo de metabólitos tóxicos devido à limitação de transferência de massa.

A Figura 2.6 é um exemplo de algas marrons, de onde é extraído o alginato.



Fig. 2.6 - Foto de alga marrom (www.flog.clickgratis.com.br/biomas/foto/algas-marrons)

Um dos principais benefícios de seu uso é a sua não toxicidade tanto para as células quanto para o meio no qual é empregado, ou seja, devido a essa característica é bastante utilizado na indústria de alimentos.

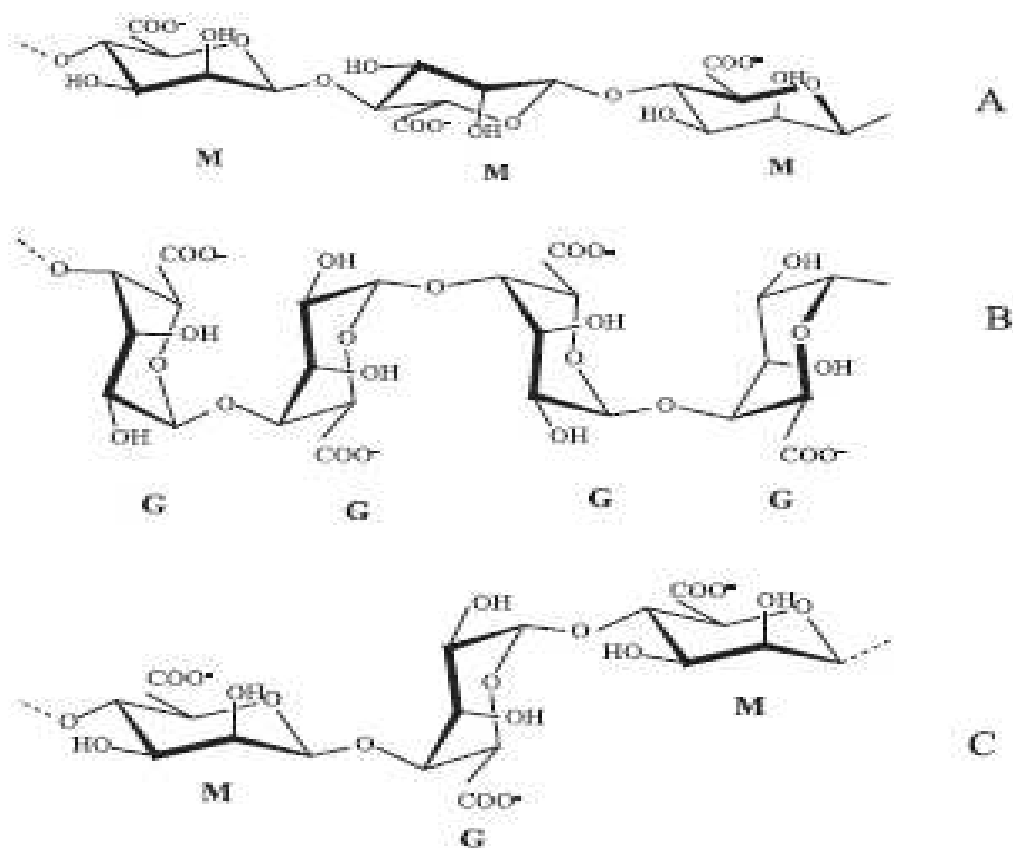


Fig.2.7 – Estrutura dos blocos homopoliméricos M e G e dos blocos heteropoliméricos MG-, que constituem de alginato. Em (A) tem-se uma sequência M-M: em (B) uma sequência G-G e em (C) uma sequência M-G-M (LEONARD *et al.*, 2004).

As propriedades de formação de um gel e a seletividade pela ligação de cátions irão depender da composição e da sequência desses monômeros, enquanto que a viscosidade da solução polimérica depende quase que exclusivamente do tamanho molecular do polímero e está relacionada basicamente com o comprimento da cadeia polimérica.

A formação do gel se dá pelo gotejamento da solução de alginato de sódio (solúvel em água) em uma solução contendo cloreto de cálcio. A ligação de íons de Ca^{+2} se dá preferencialmente nos blocos G, como ilustra a Figura 2.8. O íon cálcio é incorporado na molécula de alginato, provocando a formação de uma estrutura tridimensional denominada egg-box (GRANT *et al.*, 1973, BUCKER, 1987), esta conformação permite a formação característica dos géis, sendo a gelificação quase instantânea na superfície do gel, dirigindo-se para o interior da esfera.

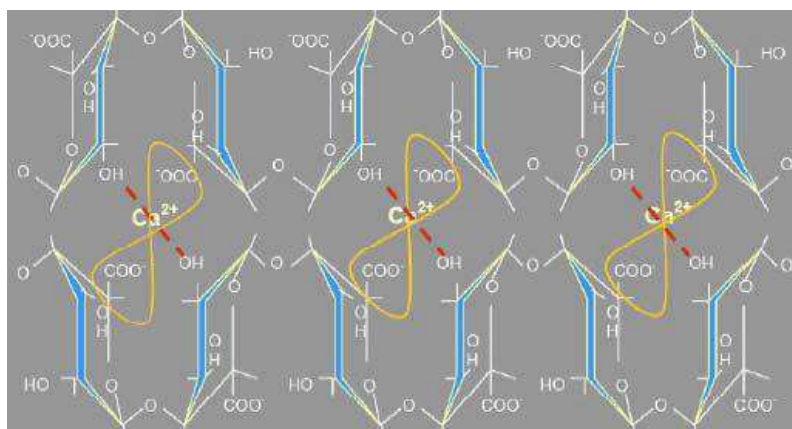


Fig. 2.8 - Esquema da formação do gel de alginato de cálcio (MARTINSEN *et al.*, 1989)

Estas partículas são facilmente separadas do meio pelo fato do alginato de cálcio ser insolúvel em água (BAYLEI e OLLIS, 1986). A Figura 2.9 mostra a estrutura do sal de ácido algínico formando o alginato de cálcio que retém as células por ser insolúvel.

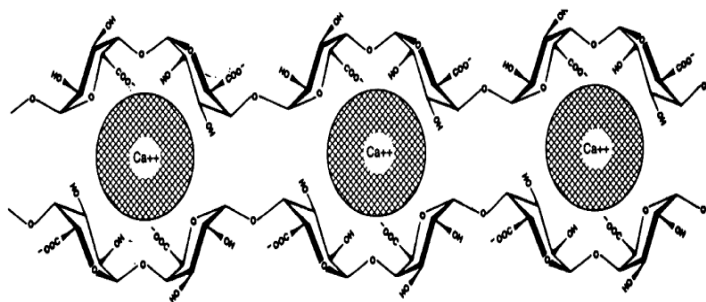


Fig. 2.9 - Modelo da estrutura do gel de alginato de cálcio (ROUSSEAU *et al.*, 2004)

A eficiência da imobilização por alginato e a qualidade do produto são influenciados pela dimensão das esferas de alginato, pela concentração de alginato, pelos aditivos utilizados, pelo tempo de processamento e pela contaminação microbiana.

As principais vantagens do uso de células imobilizadas tanto em alginato como em outros suportes são:

- Ter uma menor inibição pelos produtos;
- Possuir uma maior conversão se comparado ao sistema com células livres;
- Reduzir a fase de adaptação do micro-organismo (fase *lag*).

Podem-se citar algumas desvantagens no sistema utilizando células imobilizadas com alginato de cálcio, sendo elas:

- Não existe padronização das condições de imobilização, ou seja, a imobilização depende de diversos parâmetros, tais como a concentração de alginato, a concentração de cloreto de cálcio (solução utilizada durante a imobilização celular), a concentração inicial de células a ser confinado na matriz, o diâmetro dos *pellets*, a altura do gotejamento durante a imobilização, entre outros;

- Quando a imobilização é feita em alginato, existe uma rápida solubilidade do mesmo na presença de agentes quelantes dos íons cálcio, como fosfato, citrato e EDTA, portanto a adição de íons cálcio no meio de fermentação ou tratamentos após a gelificação é necessária visando preservar a integridade dos pellets durante a operação por tempos prolongados (BIROL *et al.*, 1998).

2.2.3 – Gerador de formulações sólidas por secagem

A secagem é um dos processos mais antigos e utilizados pela humanidade. Traub (2004) enfatizou que a secagem tem sido usada para preservação e mudanças de estado e propriedades desde os tempos bíblicos e que, durante as últimas décadas, intensos esforços foram investidos para o estudo do mecanismo e para melhorias do processo. A secagem é utilizada por muitas indústrias, desde a aplicação na minimização de produtos químicos até nos processos de fabricação de alimentos, farmacêuticos e substâncias químicas finas, e, mais recentemente como alternativas na minimização de produtos gerados no setor de tratamento de resíduos, e tem representado para as empresas entre 2 – 60% do capital e do custo de operação.

Segundo Strumillo & Kudra (1986), o material que é submetido a um processo de secagem consiste geralmente da matéria seca (esqueleto) e certa quantidade de umidade, principalmente no estado líquido. O “material úmido” apresenta diferentes propriedades físicas, químicas, estruturais, mecânicas, bioquímicas, entre outras, que resultam das propriedades do esqueleto e do estado da água no seu interior. Porém, embora todos esses parâmetros possam influenciar significativamente o processo de secagem e, assim, definir a técnica de secagem, as propriedades mais importantes são as propriedades mecânicas – estruturais, o tipo de umidade no sólido e a ligação umidade – material. Dessa forma os autores definiram os tipos de umidade que podem ser encontradas em um sólido:

- Umidade superficial: quando o líquido existe como um filme externo sobre o material devido a efeitos de tensão superficial;

- Umidade não ligada: quando todo o conteúdo de umidade presente em um material não higroscópico está na forma não ligada. Em um material higroscópico o excesso do conteúdo de umidade de equilíbrio corresponde à umidade de saturação. Esta umidade pode estar presente em duas formas: no estado funicular, onde o líquido em estado contínuo existe dentro do corpo poroso; e no estado pendular, onde o líquido em torno e entre as partículas discretas está em condição descontínua, sendo a umidade intercalada por bolhas de ar. A Figura 2.10 apresenta esquematicamente as duas formas da umidade não ligada.

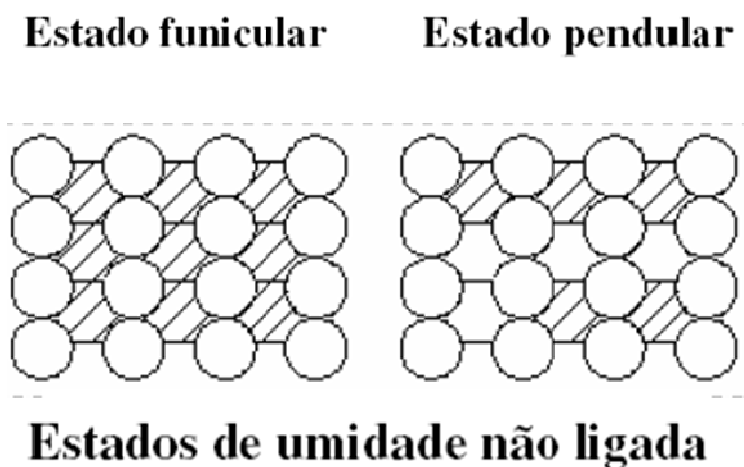


Fig. 2.10 - Estados de umidade não ligada (STRUMILLO & KUDRA, 1986).

No estado funicular, o líquido movimenta-se para a superfície externa do material por ação capilar. Com a remoção da umidade, a continuidade da fase líquida é gradualmente interrompida, devido à sucção de ar para dentro dos poros deixando porções de umidade isoladas (bolsas), formando então o estado pendular. No entanto, o fluxo capilar é possível somente em uma escala localizada. Quando o material está próximo ao estado seco, a

umidade é mantida como uma monocamada de moléculas sobre a parede dos poros e é removida principalmente por fluxo de vapor.

- Umidade ligada, higroscópica ou dissolvida: ocorre quando o líquido exerce uma pressão de vapor menor que a do líquido puro em uma dada temperatura. Esta pode estar em várias condições: na forma líquida retida em pequenos poros, em solução contida nas paredes celulares, adsorvida química ou fisicamente.

A secagem é uma forma usual de conservação e aumento da vida útil de diversos materiais como alimentos e culturas microbianas. Trata-se de um processo de remoção de água do material por meio de evaporação gerada por ação simultânea de calor, transferência de massa e momento (AKPINAR *et al.*, 2006; TURKER *et al.*, 2006; CUI *et al.*, 2004).

No campo da conservação, a secagem se destaca como forma de conservação em diversos processos a exemplo de (FU e CHEN, 2011): geração de cápsulas de probióticos para alimentação oral, fabricação de inóculos para derivados do leite, produção de suplementos alimentares a base de leveduras e células probióticas e geração de produtos bioativos com biopesticidas e bioconservadores, como *Bacillus thuringiensis*.

Embora a secagem seja forma usual de conservação, o processo de realização da mesma causa danos e morte das células, que pode ser explicado pela combinação de fatores como ruptura de membranas, modificações na composição celular (teor de ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos, carboidratos e polifostados) e outras formas de danos associadas ao calor excessivo e estresse osmótico (TURKER *et al.*, 2006; ALPAS *et al.*, 1996).

Diferentes tipos de células apresentam diferentes composições e constituintes em seu interior. Assim, a secagem afeta leveduras, fungos (Figura 2.11) e bactérias (Figura 2.12) de forma diferente, não só pela estrutura como também por características particulares do gênero e da espécie microbiana em questão (FU e CHEN, 2011)

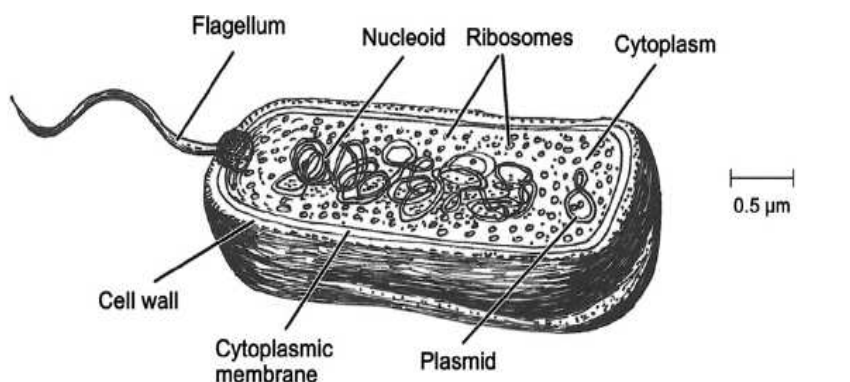


Fig. 2.11 Estrutura celular de uma célula procariote (FU e CHEN, 2011)

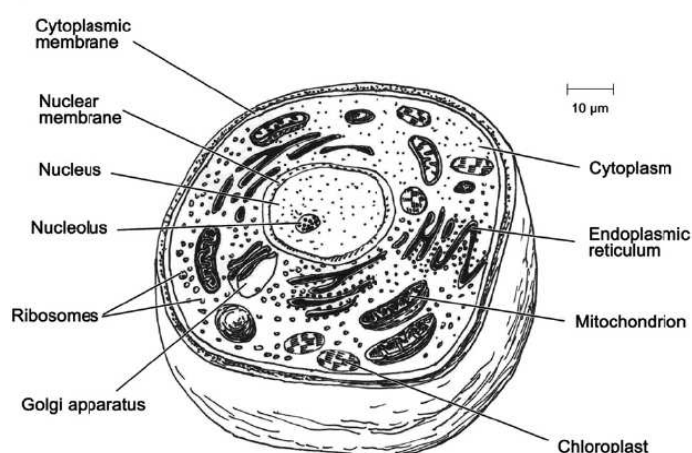


Fig. 2.12 Estrutura celular de uma célula eucarionte (FU e CHEN, 2011)

Além da composição e de outros fatores intrínsecos, a viabilidade das células é influenciada por fatores extrínsecos. A Figura 2.13 apresenta os principais fatores extrínsecos que influem em cada uma das principais etapas da conservação por secagem.

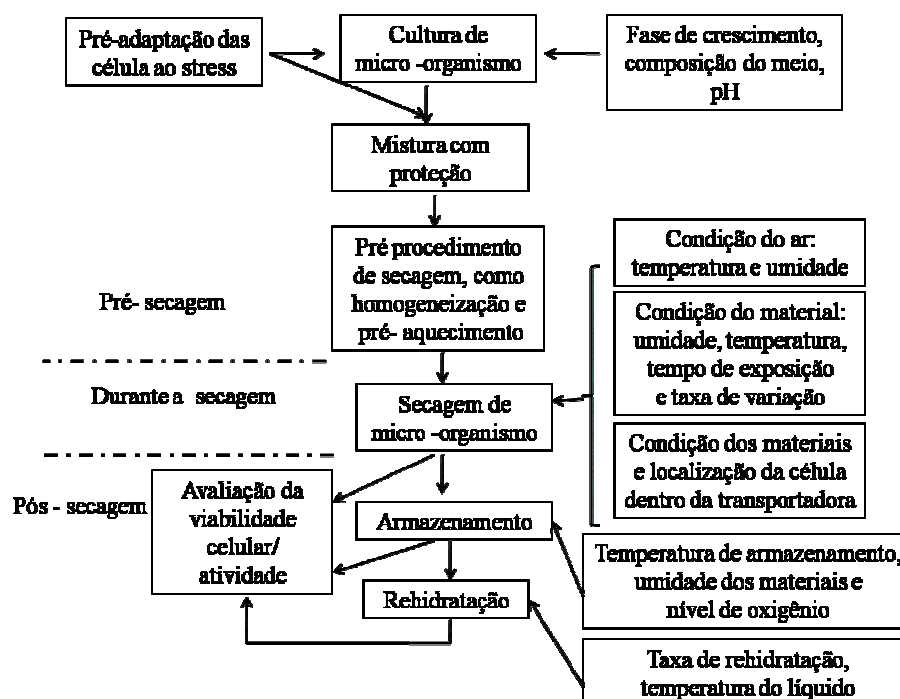


Fig 2.13 – Principais etapas de processamento durante a desidratação dos micro-organismos e importantes fatores extrínsecos em cada etapa (FU e CHEN, 2011).

Ainda referente à Figura 2.13, cabe salientar que nas etapas que antecedem a secagem, o armazenamento e a rehidratação, o uso de aditivos é bastante pesquisado como forma de melhorar o processo. O amido é um aditivo utilizado neste sentido. Estudos de

imobilização com amido e alginato são comuns para imobilização de enzimas, drogas, princípios ativos de medicamentos e células destinadas a fermentações e geração de formulações sólidas a exemplo de probióticos (HAIDER, HUSAIN, 2008; SULTANA *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2010)

2.3 – Ceras

2.3.1 - Introdução

Existem vários tipos de ceras: de origem animal, vegetal e mineral. As ceras de origem animal são provenientes de alguns animais terrestres, alguns animais aquáticos e insetos, As ceras de origem vegetal vêm das folhas de algumas plantas e a cera de origem mineral é proveniente da destilação fracionada do petróleo.

Os dois principais grupos de insetos produtores de ceras são:

- O *Apidae*, do qual as abelhas são os principais membros;
- O *Coccidae*, ao qual pertence a *Coccus ceriferus*, que produz a cera chinesa.

Dentro da ordem *Apidae*, existem três gêneros: o gênero *Apis* que tem a maior ordem social, produzindo importantes colméias; o gênero *Melipoma*, *Trigona* e *Tetrasoma* das abelhas menores e o gênero *Bombus*, conhecido com “mamangaba” ou “abelhão” que não é tão abundante como as outras abelhas (Warth, 1947)

2.3.2 – Cera na apicultura

As abelhas são insetos que pertencem ao reino animal, à classe *Insecta*, ordem *Hymenoptera*, gênero *Apis*, espécie *mellifera* I (PINHO, 1997). Surgiram na face da Terra há mais de 50 milhões de anos e sempre estiveram presentes em civilizações antigas como as gregas e egípcias (DUARTE, 2006).

A introdução de abelhas no Brasil é atribuída aos jesuítas que estabeleceram suas missões no século XVIII, nos territórios que hoje fazem fronteira entre o Brasil e o Uruguai (SAÚDE ANIMAL, 2009).

2.3.3 - Cera de Abelha

O gênero *Apis* ocupa o papel mais importante economicamente no comércio de ceras de abelhas. Dentro do gênero *Apis* tem-se varias espécies: a abelha gigante *Apis dorsata*; a média *Apis indica*, ambas da Ásia; *Apis flórea*, a minúscula abelha do oeste da Índia e por último a domesticada abelha do mel *Apis mellifica*.

Existem muitas raças de *A. mellifera*, praticamente tantas quantas são os países em que ela foi domesticada – por todo o mundo. As ceras obtidas dessas diversas raças diferem muito pouco em suas características físicas ou constantes químicas (Warth, 1947).

A cera de abelha é um produto gorduroso usado para diversas finalidades (cosméticos, farmácia, alimentos, etc.). O regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de ceras de abelhas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil a define como sendo um produto de consistência plástica, de cor amarelada, muito fusível, secretado pelas abelhas para a formação dos favos nas colméias (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) (Figura 2.14).

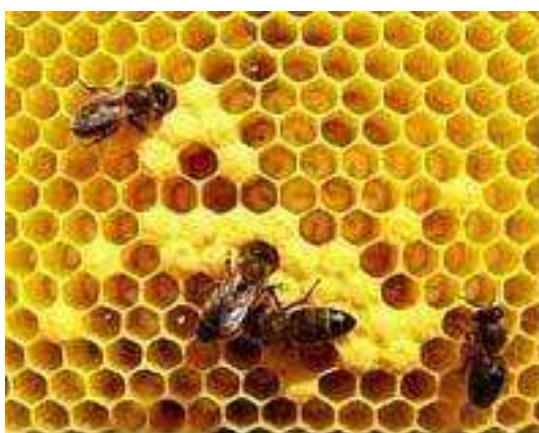


Fig. 2.14 – Foto de cera de abelha (www.biologiapronta.blogspot.com)

2.3.3.1 – *Histórico da cera de abelha*

Conhecida desde a mais remota antiguidade era usada, dentre outras inúmeras aplicações, como pagamento de tributos, taxas e multas. Em 181 D.C., Córsega pagava a Roma um tributo anual de 38 toneladas de cera (COUTO, 1996).

Povos primitivos utilizavam-na na mumificação de cadáveres; na mitologia grega as asas de Ícaro, que permitiram sua saída de Atenas, eram fixadas a seu corpo com cera (CRIAR E PLANTAR, 2011).

A cera possui oxidação lenta, dura por muito tempo, desde que não seja atacada por traças da cera ou exposta a altas temperaturas (COUTO, 1996).

2.3.3.2 – Como é produzida?

A cera de abelha é um produto fisiológico produzido dentro da colméia pelas abelhas cerígenas. Para sua elaboração as abelhas engolem e digerem o mel, transformam o alimento em gordura e, em 24 horas já estarão fornecendo cera (MAGALHÃES, 2001). As glândulas cerígenas, mostrada na Figura 2.15, localizam-se na parte ventral do abdômen das abelhas e são compostas de quatro pares que se projetam lado a lado nos últimos segmentos abdominais. A cera é expelida dessas glândulas na forma líquida e se solidifica somente quando entra em contato com a temperatura ambiente (MAGALHÃES, 2001; PEREIRA, 2008; ZOVARO, 2006).

As abelhas produzem cera para a construção dos favos e para a operculação, que é o processo pelo qual as abelhas fecham os alvéolos (de cria e de mel) com uma fina camada de cera. A cera de opérculo é a que oferece melhor qualidade e menor índice de impurezas (MAGALHÃES, 2001; PEREIRA, 2008; ZOVARO, 2007).

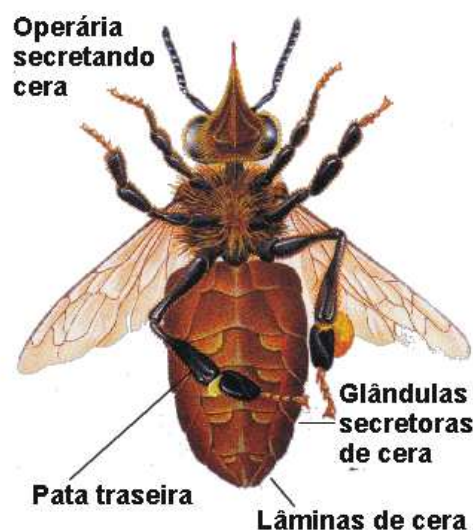


Fig. 2.15 – Abelha operária com a localização das glândulas secretora de cera (www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/abelhas/abelha)

Logo que é excretada, a cera de abelha é branca, mas rapidamente muda de cor. Um dos principais motivos é a presença de pólen, que também é liberado pela abelha no estado sólido ou líquido. Diferentes tipos de pólen conferem diferentes tonalidades às ceras, por exemplo: o girassol (*Helianthus bolanderi*), um amarelo brilhante, o trevo branco (*Trifolium*

repens), apenas um traço de amarelo, enquanto que o pólen da alfafa, linho e azevinho, entre outros, não dão coloração (VANSELL & BISSON, 1940).

2.3.3.3 - Composição química

As ceras de abelhas são obtidas pelo homem através dos favos construídos pelas abelhas. Elas apresentam uma complexa composição de mais de 300 substâncias, número variável dependendo da origem. Trata-se de uma mistura de hidrocarbonetos, mono, di, tri e poliésteres, álcoois e ácidos livres além de uma infinidade de outras substâncias em pequena quantidade. Um trabalho publicado utilizando a técnica de cromatografia gasosa com espectrometria de massas (GCMS) apresenta um panorama desta composição para algumas ceras de abelhas europeias (TULLOCH, 1980). A Tabela 2.3 mostra este panorama.

Tab. 2.3 – Composição média da cera de abelhas

Espécies	Teor (%)
Hidrocarbonetos	14
Monoésteres	35
Diésteres	14
Triésteres	3
Hidroxi monoésteres	4
Hidroxi poliésteres	8
Ésteres ácidos	1
Poliésteres ácidos	2
Ácidos livres	12
Alcoóis livres	1
Não identificados	6
Total hidrocarbonetos	14
Total ésteres	67
Total ácidos	12
Total álcoois	1
Outros	6

A Tabela 2.4 lista as especificações físico-químicas e organolépticas da cera clarificada de abelha, as quais são de extrema importância na confecção das esculturas de cera (OLIVEIRA, 2002).

Tab. 2.4 - Especificações físico-químicas e organolépticas da cera clarificada de abelhas

Parâmetro	Especificações
Aparência	Barra
Cor	Amarelado
Odor	Característico
Faixa de fusão, °C	Max. 65°C
Índice de acidez, mg KOH/ g amostra	17,0 – 24,0

2.4 - Cremes de leite

A palavra nata e creme significam o mesmo produto e podem ser usadas sem distinção conforme a legislação vigente e os costumes de cada país (PEREDA *et al.*, 2005).

O creme de leite é a gordura do leite separada dos demais sólidos que constituem o extrato seco. Os distintos tipos de creme se fabricam tanto para a venda ao consumidor como para o uso industrial, com várias porcentagens de gordura, em função da destinação a ser-lhe dada. Sua viscosidade e textura, assim como a capacidade de formar espuma, dependem, essencialmente, da quantidade de gordura presente em cada variação do produto (EARLY, 2000).

O creme de leite é uma emulsão de gordura em água, produto de composição muito similar à do leite integral, exceto pela alta quantidade de gordura de leite que é adicionada para caracterizar o tipo de creme a ser produzido, podendo ser descrito como o leite cujo soro foi removido, caracterizando-se por ser um produto lácteo rico em gordura, resultante da desnatação do leite (BRASIL, 1996).

De fato, a única diferença significativa entre o creme de leite e o leite integral é a proporção de gordura e soro, realçando-se no creme a gordura. A extensão deste realce depende da finalidade para a qual o creme é produzido, podendo refletir inclusive no nome dado ao produto (BRASIL, 1996).

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Creme de Leite (BRASIL, 1996), creme de leite é o produto lácteo rico em gordura, retirada do leite por

procedimentos tecnologicamente adequados, que apresenta a forma de uma emulsão de gordura em água. O produto submetido à comercialização deve ser pasteurizado, esterilizado ou tratado por Ultra Alta Temperatura.

O creme de leite pode ser obtido naturalmente após o repouso do leite e separação dos elementos que o compõem em função da diferença entre suas densidades. Na obtenção industrial este processo é acelerado e realizado pelo uso de centrífugas chamadas “separadoras” ou “desnatadeiras” (EARLY, 2000).

Esse processo térmico é obrigatório uma vez que se trata de um subproduto de leite o qual possui características nutritivas, se tornando extremamente susceptível à contaminação por micro-organismos, podendo causar sérios danos à saúde do consumidor, como a tuberculose (ALVES, 2003).

O creme de leite é considerado um produto nobre, porém, na última década houve um aumento considerável no seu consumo, especialmente em virtude da estabilização da economia brasileira, que possibilitou o aumento do poder de compra dos consumidores (MOURA, 2001). No Brasil, o consumo de creme de leite gira em torno de 90.000 ton/ano, sendo bastante utilizado em receitas salgadas, incorporado em molhos, tortas, estrogonofe, massas em geral, e doces, como mousses, pavês, coberturas, recheios de sobremesas, com salada de frutas e até mesmo em cafés.

O creme de leite possui duas variedades, como:

- Creme de mesa: produto obtido em condições especiais e destinado ao consumo direto ou à aplicação em culinária.
- Creme de indústria: produto obtido e tratado para fins de fabricação de manteiga e outros produtos (MOURA, 2001).

Baseado no teor de gordura é classificado como creme de alto teor de gordura, creme de leite ou apenas creme e creme de baixo teor de gordura quando apresentarem, respectivamente, 50%, de 20% a 49,9% e de 10 a 19,9% deste componente (MAPA, 1996).

A composição nutricional média do creme é de 30 a 40% de gordura, 59% de água e 6% de elementos não graxos (proteínas, lactose e minerais). É um produto alimentício rico em cálcio e vitaminas lipossolúveis (A, D, E, e K) (KJAERBYE, 1996).

2.5 - Fatores que interferem no metabolismo dos micro-organismos

O ser humano vive hoje num ambiente de constante competição com outros seres vivos em busca de alimentos para a perpetuação da espécie. Dentre esses seres vivos estão os

micro-organismos, que compõem um universo formado por fungos, bactérias, vírus e protozoários, que podem se reproduzir nos alimentos, industrializados ou não, alterando sua qualidade e interferindo em sua vida útil, ou ainda causar doenças à saúde do consumidor.

Durante a estocagem e a conservação, o alimento está exposto às adversidades ambientais, tais como temperatura, umidade, tensão de oxigênio e luz, que podem iniciar uma série de reações que levam à degradação do alimento.

Tanto as reações químicas quanto a capacidade de sobrevivência ou de multiplicação dos microrganismos presentes nos alimentos depende de características próprias desses alimentos, denominadas fatores intrínsecos ou das condições em que o alimento se encontra, caracterizadas como fatores extrínsecos. A atividade de água (A_w), o pH, o potencial de oxiredução (Eh), a composição química, a presença dos fatores antimicrobianos ou antioxidantes naturais e as interações entre os microrganismos ou entre os compostos químicos presentes nos alimentos são considerados parâmetros intrínsecos. Entre os parâmetros extrínsecos, os mais importantes são a umidade a temperatura ambiente e a composição química da atmosfera que envolve o alimento (FRANCO; LANDGRAF, 2005; SENAI, 2000).

A combinação de fatores extrínsecos e intrínsecos pode servir como obstáculo ao ataque dos microrganismos, às alterações químicas e às alterações físicas, originando o conceito dos obstáculos de Leistner. A atuação sinérgica destes fatores melhora a estabilidade, e conseqüentemente, a qualidade do alimento, tornando-o inócuo à saúde do consumidor (CASTRO *et al.*, 2008, FRANCO; LANDGRAF, 2005; SENAI, 2000).

2.5.1 - Fatores Intrínsecos

2.5.1.1 - *Atividade de Água (A_w)*

Refere-se à medida do estado de energia de água em um sistema presente em um produto, que favorece o crescimento microbiano e reações químicas. Valores de A_w entre 0,8 a 1,0 favorecem principalmente o crescimento de bactérias. Fungos e leveduras podem crescer em ambientes com menor valor de atividade de água.

Para Frazier (1972), as bactérias têm níveis mínimos de A_w para crescimento muito mais altos que os encontrados para leveduras e fungos, como mostra a Tabela 2.5.

Tab 2.5 – Valores mínimos de A_w que permitem a multiplicação de micro-organismos que alteram os alimentos (FRAZIER, 1927).

Grupo de Micro-organismos	Valor mínimo de A_w
Bactérias patogênicas	0,92
Maiorias das bactérias	0,91
Maioria das leveduras	0,88
Maioria dos bolores	0,80
Bactérias halofílicas	0,75
Fungos xerofílicos	0,65
Leveuras osmofílicas	0,60

A atividade de água (A_w) de um alimento quantifica o grau de ligação da água contida no produto e conseqüentemente sua disponibilidade para agir como um solvente particular das transformações químicas, bioquímicas e microbiológicas (LABUZA, 1977).

Os seguintes fatores contribuem para a redução da A_w nos produtos (LONCIN & MEARSON, 1979):

- A dissolução de componentes diminui a pressão de vapor de água. Esta é a principal razão para o abaixamento da A_w em frutas secas e em produtos salgados;
- A água pode se ligar nos grupos hidrofílicos do material formando camadas, que são sucessivamente menos e menos ligadas;
- Líquidos presentes nos capilares estão sujeitos a uma pressão de sucção;
- Cristais podem aparecer em produtos sólidos para os quais a água de hidratação tem uma baixa pressão de vapor.

Os efeitos de água nas reações químicas dos alimentos são mais complicados do que os seus efeitos no crescimento de micro-organismos.

As velocidades de algumas transformações em alimentos, como função da A_w do produto, foram demonstradas esquematicamente na Figura 2.16.

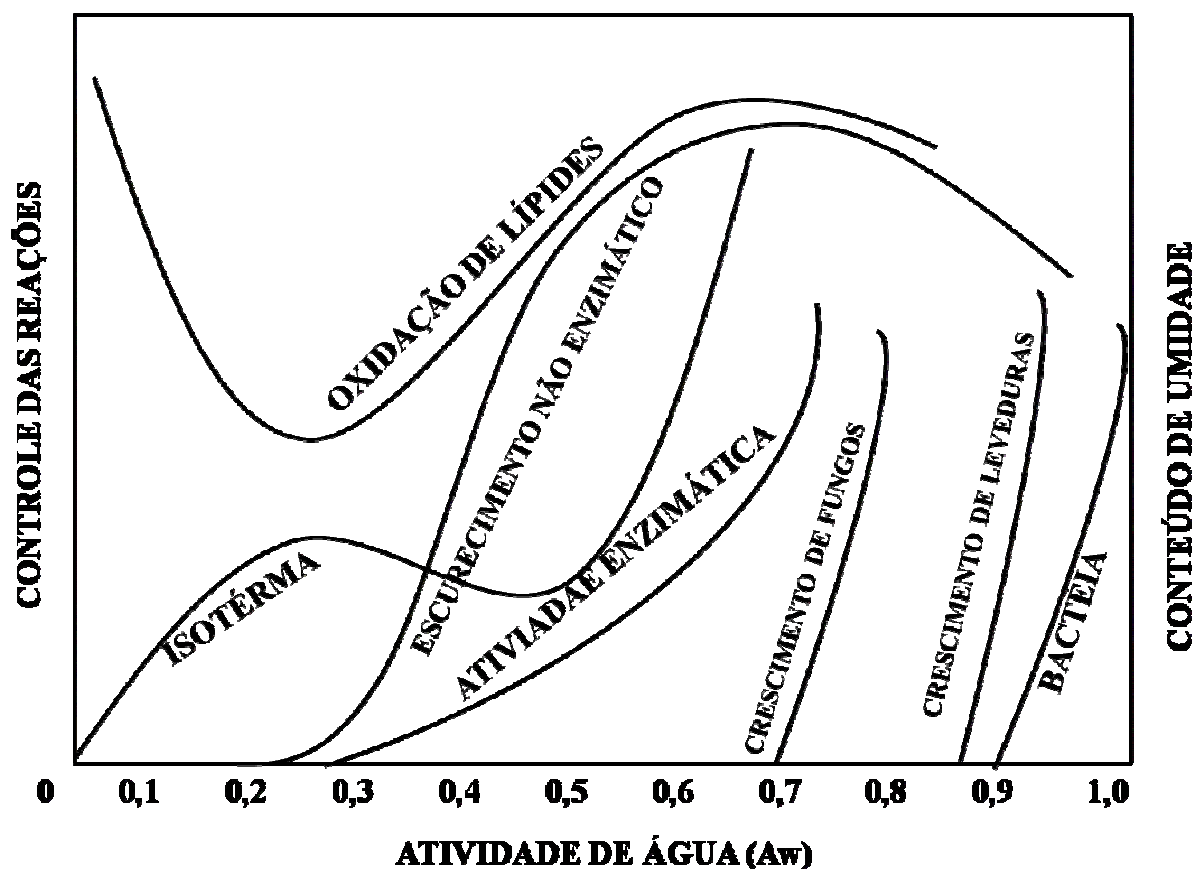


Fig. 2.16 – Mapa das transformações de alimentos em função da atividade de água (LABUZA, 1970)

A umidade não é um indicador seguro para prever atividade microbiana e reações físico-químicas (SILVA, 2008).

A estabilidade e a segurança de um alimento, além de outras propriedades, são mais previsíveis pela medida da atividade de água do que do teor de umidade. A determinação da atividade de água não fornece uma estimativa real, entretanto correlaciona-se suficientemente bem com as velocidades de crescimento microbiano e de outras reações de deterioração, sendo assim um indicador útil quanto à estabilidade de um produto e sua segurança microbiológica (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

As reações têm sua velocidade reduzida com a diminuição da atividade de água, até que numa A_w abaixo de 0,2 todas as reações estejam praticamente inibidas, com exceção da oxidação de lipídeos. Dependendo da atividade de água, a oxidação de lipídios passa por um mínimo, depois sofre uma rápida elevação (DITCHFIELD, 2000).

A cinética de muitas reações depende da atividade de água, tais como inativação de enzimas, a destruição de microrganismos, a reação de Maillard, a gelatinização do amido e a desnaturação de proteínas durante o cozimento, entre outros (DITCHFIELD, 2000).

Cada microrganismo tem uma atividade de água máxima, ótima e mínima na qual se desenvolve mais rapidamente em um determinado sistema (SILVA, 2000).

2.5.1.2 - Valor pH

O valor de pH é uma propriedade físico-química própria de cada substância química. Seu valor é determinado pela concentração de íons de Hidrogênio (H^+) e varia entre 0 e 14; os valores de 0 a 7 são considerados ácidos, valores em torno de 7 neutros e valores acima de 7 são denominados básicos ou alcalinos. Quanto menor o pH de uma substância, maior a concentração de íons de hidrogênio (H^+) e menor a concentração de íons hidroxilas (OH^-).

Ainda que o crescimento de micro-organismos seja possível numa faixa ampla de pH, existem valores de pH mínimo, ótimo e máximo para sua multiplicação. Verifica-se que o pH em torno da neutralizada (6,5 – 7,5) é o mais favorável para a maioria dos micro-organismos.

Alimentos de baixa acidez ($pH > 4,5$) são os mais sujeitos a multiplicação microbiana, tanto de espécies patogênicas quanto de espécies deteriorantes. Já os alimentos ácidos (pH entre 4,0 e 4,4), há predominância de crescimento de leveduras, de bolores e de algumas poucas espécies bacterianas, principalmente bactérias lácticas. Nos alimentos muito ácidos ($pH < 4,0$), o desenvolvimento microbiano fica restrito quase que exclusivamente a bolores e leveduras (FRANCO; LANDGRAF, 2005). A Tabela 2.6 mostra os valores de pH que favorecem o ótimo crescimento dos micro-organismos.

Tab. 2.6 – Valores de pH ótimo para o crescimento de cada micro-organismo (FRAZIER, 1972).

pH > 4,5 Alimentos de baixa acidez	Predominância de crescimento bacteriano
pH entre 4,5 e 4,0 Alimentos ácidos	Predominância de leveduras oxidativas ou fermentativas e de bolores (em aerobiose)
pH < 4,0 Alimentos muito ácidos	Restrito quase que, exclusivamente, às leveduras e bolores.

O pH de um alimento não exerce apenas influência sobre a velocidade de multiplicação dos micro-organismos, mas também interfere na qualidade dos alimentos, durante o armazenamento, o tratamento térmico, a dessecação, ou durante qualquer outro tipo

de tratamento, ou seja, é também responsável direto pela deterioração de produtos alimentícios (SILVA, 2000).

2.5.2 - Fatores extrínsecos

2.5.2.1 - Temperatura

A temperatura é o fator externo que mais afeta o crescimento dos micro-organismos. Em geral, quanto mais elevada for a temperatura, maior será a velocidade do crescimento, ainda que existam faixas próprias do ótimo desenvolvimento para cada micro-organismos ou grupamento deles. Assim, de acordo com suas temperaturas ótimas de crescimento, os micro-organismos são classificados em psicrófilos, mesófilos e termófilos. (SANTIAGO, 1972).

Os micro-organismos mesófilos têm seu ótimo de crescimento entre 10 e 40°C, os termófilos crescem entre 43 e 66°C e os psicrotróficos são aptos ao crescimento, mais precisamente à temperatura de refrigeração, ou em torno de 5°C (EVANGELISTA, 1987).

2.5.2.2 – Umidade relativa do ar

Efetivamente, a umidade relativa do ar é um dos fatores extrínsecos que mais influem no desenvolvimento microbiano (PARDI *et al.*, 2001).

Para seu crescimento, são as bactérias que mais necessitam de umidade relativa elevada, o que ocorre em torno de 92%. Os fungos são os menos exigentes, necessitando em torno de 85 a 90%, e as leveduras, de 90%.

Efetivamente, todos os micro-organismos requerem muita água para o seu desenvolvimento, sendo maior a proporção desta necessidade provida pela umidade disponível na própria carne (PARDI *et al.*, 2001).

2.6- Antioxidantes

A deterioração do alimento com o tempo, em razão de sua natureza biológica, é inevitável. Durante a produção, o processamento, a distribuição e o armazenamento ocorrem várias reações de deterioração envolvendo micro-organismos e processos químicos. Estes últimos são representados pela oxidação enzimática e não-enzimática de lipídeos e de substâncias fenólicas, promovendo alterações indesejáveis no *flavo*, na aparência, nas características físicas, no valor nutritivo e na formação de compostos tóxicos (ARAÚJO, 2006).

O efeito do antioxidante consiste na inativação dos radicais livres, na complexação de íons metálicos ou na redução dos hidroperóxidos para produtos incapazes de formar radicais livres e produtos de decomposição rançosos (ARAUJO, 2006).

Existem duas categorias básicas de antioxidantes: sintéticos e naturais. Em geral, os antioxidantes sintéticos são estruturas fenólicas contendo variáveis graus de substitutos alquilas, enquanto os naturais são compostos fenólicos, quinonas, lactonas e o polifenóis (ARAUJO, 2006).

Com base nas suas funções, os antioxidantes são classificados como primários e sinérgicos.

Os antioxidantes primários incluem os compostos fenólicos poliidroxilados (galatos) e os fenóis com impedimento estrutural (BHA, BHT, TBHQ e tocoferóis). Atuam bloqueando a ação dos radicais livres, convertendo-os em produtos estáveis por meio da doação de hidrogênio ou elétrons, além de atuarem nas reações com os radicais lipídicos, formando o complexo *antioxidantes-lipídicos* (ARAUJO, 2006).

Os antioxidantes sinérgicos são classificados de forma genérica como removedores de oxigênio e complexantes. Os sinérgicos funcionam por vários mecanismos. Podem atuar na regeneração do radical fenoxil, doando hidrogênio e, conseqüentemente, regenerando o antioxidante primário. Dessa forma, o antioxidante fenólico pode ser utilizado em baixas concentrações se sinérgico é simultaneamente adicionado ao alimento. Por exemplo, o ácido ascórbico e o palmitato de ascorbila atuam como sinérgicos para os antioxidantes primários (ARAUJO, 2006).

2.6.1 - Ácido Ascórbico (Vitamina C)

A vitamina C é um cristal sólido, inodoro, de sabor ácido. Sua fórmula empírica é $C_6H_8O_6$ e tem peso molecular de 176 (BRURTON, 1976). Pode ocorrer no organismo como ácido L-ascórbico e na forma oxidada (ácido dihidroascórbico) (CORNATZER, 1989). Os produtos de degradação do ascorbato são além do ácido dihidroascórbico, ácido 2,3 - dicetogulônico, ácido oxálico e ácido L-treônico; destes apenas a ascorbona e obviamente o ascorbato possuem atividade antiescorbútica (BURTON, 1976).

O ácido ascórbico é um composto de seis carbonos, estruturalmente relacionado à glicose e a outras hexoses. Sofre oxidação reversível no corpo em ácido desidroascórbico, composto que possui a atividade integral da vitamina C (Figura 2.17).

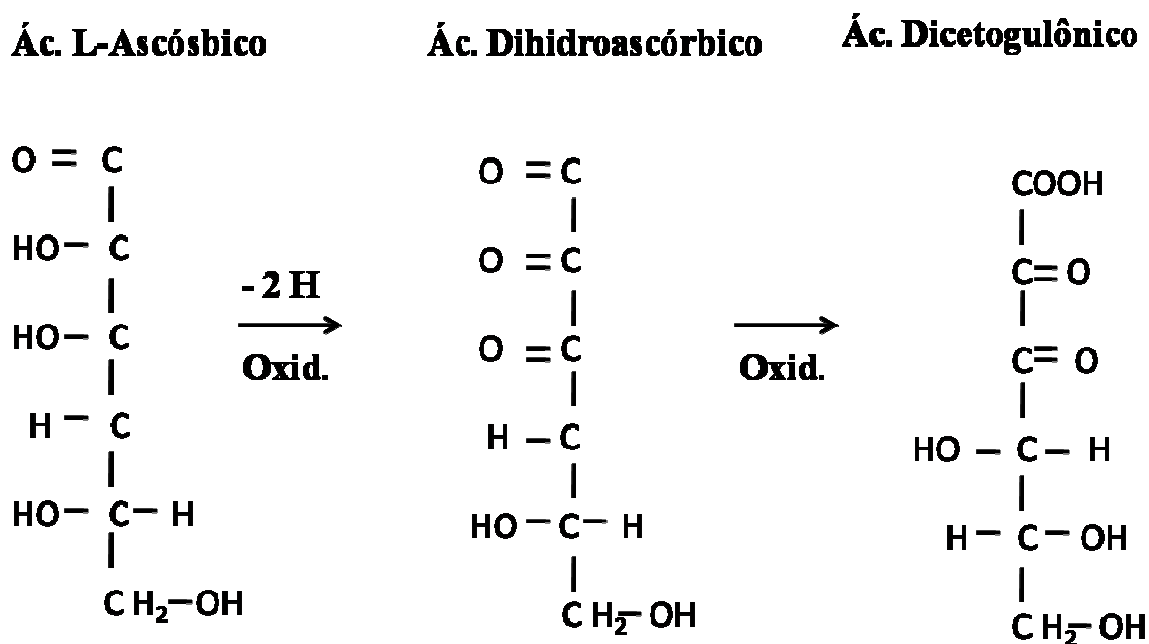


Fig. 2.17 - Fórmula química da Vitamina C

http://acd.ufrj.br/consumo/disciplinas/t_qb_tecanalises.htm

A vitamina C ou ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel necessária para muitas importantes funções biológicas, como síntese de hormônios, neurotransmissores, colágeno, carnitina e também para absorção de ferro e outras substâncias (MAIANI *et al.*, 1993). Atualmente, muita importância tem sido dada à sua atuação como antioxidante e capacidade de inibição da carcinogênese.

2.7 - ESPESSANTES

Espessante, segundo Baruffaldi (1998), é a substância capaz de aumentar, nos alimentos, a viscosidade de soluções, de emulsões e de suspensões. São substâncias químicas que aumentam a consistência dos alimentos. São hidrossolúveis e hidrofílicas, usadas para dispersar, estabilizar ou evitar a sedimentação de substâncias em suspensão. Emprega-se em tecnologia de alimentos e bebidas como agentes estabilizadores de sistemas dispersos como suspensões (sólido-líquido), emulsões (líquido-líquido) ou espumas (gás-líquido) (HEBBEL, 1979).

Estabilizante, contudo, trata-se de substância que favorece e mantém as características físicas das emulsões e das suspensões.

Estes dois aditivos geralmente são tratados juntos pelo fato de existirem muitos espessantes com características e propriedades de estabilizantes. Além disso, alguns estabilizantes não contidos na listagem dos espessantes pois possuem capacidade de aumentar o grau de viscosidade das soluções, emulsões e suspensões caracterizando-se, portanto como espessantes (BARUFFALDI, 1998).

A grande maioria dos espessantes é composto de carboidratos naturais (goma guar, goma arábica) ou ainda o modificado quimicamente (carboximetilcelulose).

2.7.1 - Hidrocolóide

Hidrocolóides são polímeros hidrofílicos de cadeia longa, de origem vegetal, animal, ou sintéticos, que geralmente contêm muitos grupos hidroxilas e, dependendo da sua estrutura, podem apresentar características de polieletrólitos (PHILLIPS, 2000).

Segundo Penna (2004) os hidrocolóides são polímeros de cadeia longa, de alto peso molecular, extraídos de plantas marinhas, sementes, exsudados de árvores e de colágeno animal. Alguns são produzidos por síntese microbiana, enquanto outros, por modificação de polissacarídeos naturais. Estes polímeros se dissolvem ou se dispersam, em água, para dar espessamento ou efeito de aumento de viscosidade e, dependendo das suas características estruturais, podem formar géis.

As propriedades físico-mecânicas desses polímeros são influenciadas pelo peso molecular, pela distribuição do peso molecular, pelo tipo de estrutura, pela sua origem natural ou sintética e pelo método de preparação (PHILLIPS, 2000; CHAPLIN, 2011).

Os hidrocolóides se diferenciam em função de suas configurações, distribuição espacial dos monômeros formadores, ramificações e do fato de possuírem ou não características de polieletrólitos (PENNA, 2004; MACDIARMID, 2002). Os hidrocolóides podem exibir uma larga escala de conformações em solução, uma vez que ao longo da cadeia polimérica, as ligações podem girar livremente dentro da região intermolecular, podendo alterar as propriedades físicas das soluções. (CHAPLIN, 2011).

Lara (1991), em estudos com a carragena, um hidrocolóide natural, observou que a viscosidade da solução composta pela carragena aumenta em razão do aumento da concentração de polímero; este aumento da viscosidade resulta de uma maior interação entre as cadeias de polímeros.

Outros polímeros, tais como: alginatos, gelanas e xantanas, comumente formam estruturas multi-helicoidais (SUTHERLAND, 1994) e podem se agregar através de ligações

de hidrogênio, para formar géis altamente hidratados e viscoelásticos (ROSS-MURPHY, 1996).

Os hidrocolóides, com propriedades de polieletrólitos, podem apresentar estruturas rígidas e estendidas. Como exemplo de hidrocolóides de cadeia estendida pode-se citar a goma xantana que possui um acentuado caráter viscoelástico, devido a sua conformação rígida, se comparado com outras gomas de polissacarídeos, tais como: a goma guar, a goma locusta, a carboximetilcelulose de sódio, o alginato de sódio, dentre outras.

Os hidrocolóides, devido às suas propriedades especiais podem ser utilizados na suspensão, floculação, estabilização de espuma, formação de película, controle da cristalização, inibição de sinerese, encapsulação e formação de filmes. Podem atuar como clarificantes, agentes de corte, encapsulação, revestimento, agente de suspensão, turvação, desmoldante, floculante, geleificante, incorporador de ar, retentor de umidade, emulsificante, espessante, estabilizante (PENNA, 2004; PHILLIPS, 2000).

Todos os hidrocolóides apresentam duas propriedades importantes: gelificação e espessamento, às quais se configuram em maior ou menor extensão. Essas propriedades estão relacionadas com o peso molecular, a presença ou não de grupos funcionais na molécula, a temperatura do meio e com as interações de outras espécies do meio, como por exemplo, outros hidrocolóides e íons (PENNA, 2004).

2.7.2 - Classificação dos hidrocolóides

Os hidrocolóides podem ser agrupados em três categorias principais: a) gomas naturais, b) gomas modificadas ou semi-sintéticas, baseadas em modificações químicas das gomas naturais e c) gomas sintéticas, preparadas por síntese química total.

A seguir apresentamos vários exemplos de gomas (PENNA, 2004).

(a) Gomas naturais:

1- Polissacarídeos

- *Exsudato de plantas:* Arábica, Tragacante, Karaya, Ghatti;
- *Extraídas de plantas:* Pectina e Arabinogalactana;
- *Semente de planta:* Alfarroba (LBG), Guar, “Psyllium”, “Quince”;
- *Extratos de algas marinhas:* Agar, Alginato, Carragena, Furcellarana;
- *Amido:* Milho, Trigo, Arroz, Sorgo, Amido de tubérculos, Batata, mandioca;

2- Proteínas

- *Animal:* Gelatina, Albumina, Caseína;

- **Vegetais:** Proteína de soja.

(b) Gomas Modificadas ou Semi Sintéticas:

- **Derivadas de celulose:** Carboximetilcelulose, Metilcelulose, Hidroxietilcelulose, Hidroxipropilmetilcelulose e Hidroxipropilcelulose;
- **Gomas de fermentação microbiana:** Dextrana, gelana e Goma xantana;
- Alginato de propileno glicol;
- Amidos pré-gelatinizados;
- Amidos modificados: Carboximetil amido, Hidroxietil amido, Hidroxipropil amido.

(c) Gomas Sintéticas:

- **Polímeros vinílicos:** Polivinilpirrolidina (PVP), Polivinilálcool (PVA), Polímero carboxivinil, (Carbopol) e Polímeros de óxido de etileno.

Para a escolha e a aplicação de um determinado hidrocolóide, além de considerar as propriedades funcionais desses polímeros, deve-se considerar também outros fatores relevantes, tais como: a) *Aparência do produto final:* gelatinidade, maciez e habilidade para fluir, b) *Compatibilidade:* com os constituintes funcionais do sistema e com aditivos funcionais e inertes do sistema, c) *Conservação:* condições bacteriológicas, compatibilidade com conservantes e com bactérias, d) *Considerações legais:* toxicidade, “GRAS”, padrões de identidade e níveis permitidos, e) *Estabilidade:* temperatura, umidade, tempo e embalagem, f) *Propriedades:* não iônica, estabilidade ao ácido, formador de filme e estabilizador de espuma, g) *Tipo de aplicação:* mistura seca, líquido concentrado ou diluído, gel ou pasta, h) *Uso combinado:* Efeito sinérgico e efeitos antagônicos e i) *Viscosidade:* consistência, tixotropia e dilatabilidade (PENNA, 2004).

2.7.2.1- Carboximetilcelulose (CMC)

A Carboximetilcelulose (CMC), obtida através da reação da celulose com monocloroacetato de sódio, é um hidrocolóide que contribui para a formação de gel, na retenção de água, além de apresentar propriedades de polieletrólito (KÄISTNER, 1997).

A presença de substituintes com grupos $-\text{CH}_2\text{-COOH}$ na cadeia de celulose produz um afastamento das cadeias poliméricas e permite uma maior penetração de água, conferindo a CMC solubilidade em água a frio.

A estrutura da CMC é baseada no polímero de β -(1,4)-D-glucopirranose da celulose (Figura 2.18).

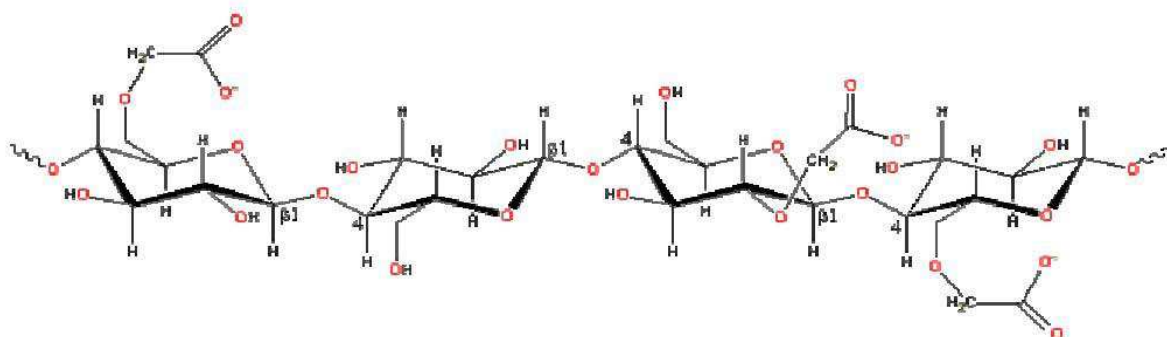


Fig. 2.18 - Molécula da Carboximetilcelulose (CMC) (KÄISTNER, 1997)

A Tabela 2.7 mostra algumas informações referentes às propriedades e aplicações da carboximetilcelulose.

Tab. 2.7 - Informações sobre a carboximetilcelulose (MANO & MENDES, 1998)

Preparação	<ul style="list-style-type: none"> • Modificação Química – Celulose, ácido monoclóro-acético, hidróxido de sódio, água, 20 – 100°C.
Propriedades	<ul style="list-style-type: none"> • Peso Molecular: d: 1,59. • Cristalinidade: amorfo: Tg: -; Tm: 250°C dec. • Material termorrígido físico: Solubilidade em água. Atacável por micro-organismos.
Aplicações	<ul style="list-style-type: none"> • Em cosméticos: espessante em loções, xampus, etc. • Em alimentos: espessante em preparações dietéticas. • Em tintas: espessantes em emulssões aquosas.
Nomes comerciais	<ul style="list-style-type: none"> • Tylose
Observações	<ul style="list-style-type: none"> • A solubilidade de CMC depende do grau de substituição. A substituição das hidroxilas pelas carbometoxilas reduz as ligações hidrogênicas, libera as macromoléculas e aumenta a solubilização em água. • CMC industrial tem DS entre 0,4 – 0,8

2.7.2.2 - Amido

O amido é o principal item de a dieta alimentar (GALLANT *et al.*, 1982). Devido às suas propriedades funcionais, tanto das formas naturais quanto das modificadas, e de seu baixo custo, é de grande utilização na confecção de alimentos (SANDERSON, 1981). O amido é uma matéria prima renovável, biodegradável e não tóxica (VAN DER BURGT *et al.*, 2000), e constituído essencialmente por polímeros de α -D-glucose.

O amido é um homopolissacarídeo formado por duas frações: amilose e amilopectina. A primeira composta por unidade de glucose com ligações glicosídicas α 1-4 e a segunda, por unidades de glucose em α 1-4 com cadeias laterais de glucose ligadas em α 1-6, formando as ramificações características desta molécula (BILIADERIS, 1997).

As estruturas apresentadas por essas moléculas podem ser representadas por uma estrutura aproximadamente linear para amilose, que pode formar estruturas helicoidais, e estruturas ramificadas para amilopectina, Figuras 2.19 e 2.20 (BILIADERIS, 1997).

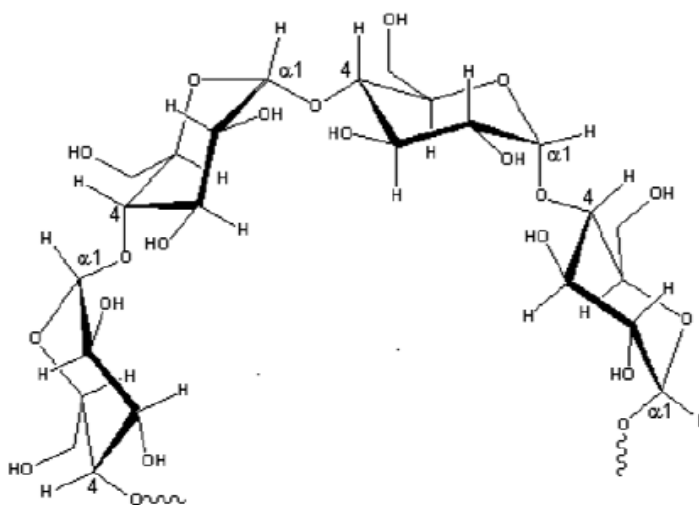


Fig. 2.19 - Estrutura da amilose (BILIADERIS, 1997)

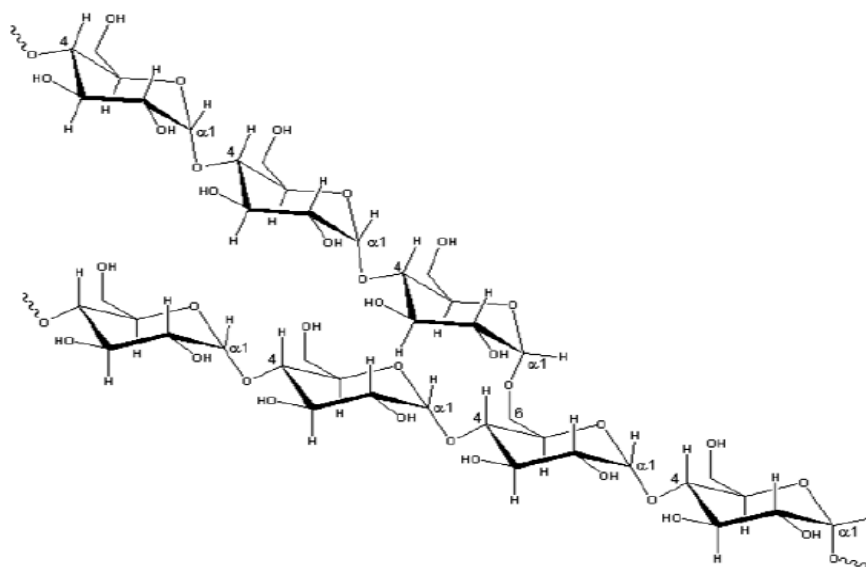


Fig. 2.20 - Estrutura da amilopectina (BILIADERIS, 1997)

Na legislação brasileira, fécula e amido são sinônimos. Na maioria dos países existe apenas uma palavra, amido, como designação geral, seguida de especificação da fonte

botânica. Denomina-se amido a fração amilácea encontrada nos órgãos aéreos, tais como grãos e frutos, e fécula a encontrada em órgãos subterrâneos como raízes e tubérculos (Brasil, 1978). A diferenciação não ocorre na composição química, mas sim na origem do produto e em propriedades funcionais e tecnológicas (VEIGA *et al.*, 1994).

O amido constitui a mais importante reserva de nutrição das plantas superiores ocorrendo na forma de grânulos de cor branca, minúsculos, distribuídos em vários locais das plantas, principalmente em órgãos armazenadores aéreos como na ervilha, feijão, milho, arroz, trigo, cevada, aveia, sorgo; nos subterrâneos como em tubérculos (batatas) e raízes (batata doce, mandioca, araruta, inhame) e nos troncos (sagú) (SWINKELS, 1985). Ocorre também em algas e, pelo fato de ser facilmente hidrolisado em açúcar e digerido, é um dos elementos mais importantes da alimentação humana. Normalmente, o amido está presente na forma de grânulos birrefringentes, cuja aparência varia de acordo com a origem. Suspensões de amido em água, por aquecimento formam géis e no processo da geleificação a birrefringência desaparece (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

O conhecimento da relação entre a estrutura molecular e granular do amido e suas propriedades físico-químicas levou ao desenvolvimento de modificações dessas estruturas a fim de obter funções especiais. Além da modificação genética, a estrutura química do amido pode ser modificada por métodos químicos ou enzimáticos, com formação de produtos com propriedades diferentes do amido natural (FRANCO *et al.*, 2001).

2.7.2.3 - Goma Xantana

A goma xantana é um polissacarídeo β -D- Glicose com celulose, mas cada unidade de glicose está ligada a um trisacarídeo de manose, ácido glucorônico e manose (Figura 2.21). A manose perto da cadeia principal tem um éster de ácido acético no carbon 6 e 4 e a manose final do trisacarídeo tem uma ligação entre os carbonos 6 e 4 no segundo carbono do ácido pirúvico.

2.8 – Análises de sobrevivência do micro-organismos

2.8.1 - Introdução

A análise de sobrevivência pode ser utilizada na avaliação de diferentes problemas a exemplo das situações descritas na Tabela 2.8 que representa estudos do tempo até a morte, tempo até falha de peças ou tempo associado ao esquecimento ou perda de uma característica. Pela variação de situações desta tabela pode-se constatar que a análise de sobrevivência encontra importantes aplicações em estudos de biologia, microbiologia, medicina, epidemiologia, engenharia, economia e marketing.

Tab. 2.8 - Análise de Sobrevivência

Tipo de estudo	Exemplos
Tempo de falha de equipamentos e processos industriais	Falha em feixes de fibra kevlar (Hill e Okoroafor, 1995)
Análise de um evento econômico	Análise de modelos de custos (Yang e Rahim, 2005)
Estudos relacionados à saúde	Estudo longitudinal da sobrevivência (Masanja <i>et al.</i> , 2008)
Avaliação de morte de uma população microbiana	Análise de sobrevivência de <i>Bacillus subtilis</i> (Abate, <i>et al.</i> , 2010)
Análise do comportamento	Dinâmica social de minorias (Carbonara e Pasotti, 2010)

Uma das características das informações que são obtidas nos estudos exemplificados na Tabela 2.5 e outras tratadas pela análise de sobrevivência é a difícil avaliação dos dados segundo modelos estatísticos tradicionais e modelos determinísticos, pois a não normalidade associada a estes dados é grande e durante o estudo temporal há um segmento de tempo diferenciado para os elementos do grupo ou participantes, ou seja, ao longo do estudo há variação da população a ser estudada e em diversos momentos o efeito a ser avaliado pode não ser observado. Esta característica de variação da população da qual se pode tirar informações ao longo do tempo significa que há a presença de censuras nas observações ou presença de dados censurados.

De forma mais geral pode-se afirmar que a Análise de Sobrevida é um modelo estatístico que consiste na analisar os tempos de permanência de um elemento no atual estado em que se encontra. Este estado pode representar falha, morte, atraso ou desenvolvimento de uma dada patologia. Estes tempos observados apresentam variações aleatórias que geram distribuições de frequência. Na Análise de Sobrevida as distribuições de frequência das análises são avaliadas por três funções: função de sobrevivência no tempo ou $S(t)$; a função de risco ou *hazard* ou $\lambda(t)$ e a função probabilidade ou $f(t)$ (LEE, WANG, 2006).

2.8.2 - Funções de Sobrevida, risco e função densidade de probabilidade

A probabilidade de sobrevivência em função do tempo (t), função de sobrevivência ou viabilidade estatística é representada por $S(t)$ e corresponde à probabilidade $p(t)$ de uma observação não falhar até certo tempo t com mostra a Equação 1 e 3 na qual T representa o tempo de vida e $F(t)$ representa a função acumulada de tempo de vida e $f(t)$ a função densidade de tempo de vida que é uma função assimétrica (skewed) com uma longa cauda pela esquerda (Sá, 2007).

$$S(t)=p(T \geq t)=1-F(t) \quad (1)$$

O gráfico de $S(t)$ é dito curva de sobrevivência. No estudo da morte ao longo do tempo para uma população não censurada de tamanho inicial N_0 , tem-se que $S(t)$ representa o número de vivos no tempo t , $N(t)$ dividido pelo número de vivos no início do estudo $N(t_0)$. Já para uma população censurada a Equação 2 não tem validade (LEE e WANG, 2006):

$$S(t)=N(t)/N(t_0) \quad (2)$$

Já a função risco, $h(t)$, pode ser constante com o tempo ou variável e é definida como sendo a razão entre a função probabilidade, $f(t)$, e a função de sobrevivência:

$$h(t)=f(t)/S(t) \quad (3)$$

Como mostra a Equação 4, o risco acumulado, $\Lambda(t)$, é definido como a integral de $h(t)$ para o intervalo de tempo correspondente do valor inicial ($t=0$) até o tempo de referência pode ser definido (t). Como sendo a razão entre a função probabilidade, $f(t)$, e a função de sobrevivência:

$$\Lambda = \int_{t=0}^t h(t).dt = -\ln(S(t)) \quad (4)$$

2.8.3 - Análise de Sobrevivência segundo modelos paramétricos

Na análise de sobrevivência objetiva-se estimar a sobrevida do elemento estudado que pode ser, conforme já discutido, células, pacientes, partes ou componentes de uma máquina entre outros itens como a sobrevivência de empresas. Esta estimativa pode ser feita por modelos teóricos e neste caso tem-se uma análise paramétrica. O modelo de primeira ordem ou exponencial é o modelo mais simples da análise paramétrica.

O modelo exponencial prevê a falha por um padrão puramente aleatório, ou seja, fatores como o tempo não afetam a sobrevivência futura, pois a taxa de risco é constante. O mesmo é descrito pelas Equações (5), (6) e (7) que apresenta sua forma generalizada que admite o parâmetro adicional tempo de garantia (G), que é o tempo mínimo de sobrevivência ou tempo com ausência de falhas ou mortes. Para $G=0$ o modelo exponencial se reduz a sua forma clássica.

$$S(t)=\exp[-\lambda.(t-G)] \quad (5)$$

$$f(t)=\lambda \exp[-\lambda.(t-G)] \quad (6)$$

$$h(t)=\lambda \quad (7)$$

Outra generalização do modelo de primeira ordem é o modelo de Weibull que foi proposto por Waloddi Weibull em 1939. Este modelo prevê um risco variável que é função do tempo e dois parâmetros do modelo ($\gamma>0$ e $\lambda>0$) que podem ser observados nas Equações (8), (9) e (10). Pela possibilidade de variação do formato da curva de distribuição, associado ao parâmetro γ , e da magnitude, dado pelo parâmetro λ , o mesmo pode ser utilizado em uma variedade de contextos mais amplo que o modelo exponencial. Neste modelo o risco aumenta com o tempo quando $\gamma > 1$, reduz com o tempo para $\gamma < 1$ e se torna um modelo exponencial (constante com o tempo) para $\gamma=1$.

$$S(t)=\exp[-(\lambda.t)^\gamma] \quad (8)$$

$$f(t)=\lambda\gamma(\lambda t)^{\gamma-1} \exp[-(\lambda.t)^\gamma] \quad (9)$$

$$h(t)=\lambda\gamma(\lambda t)^{\gamma-1} \quad (10)$$

Uma representação generalizada da função de Weibull consiste em acrescentar o termo tempo mínimo de sobrevivência ou garantia (G) como mostra nas Equações (11), (12) e (13):

$$S(t)=\exp[-\lambda^\gamma (t-G)^\gamma] \quad (11)$$

$$f(t)=\lambda^\gamma \gamma (t-G)^{\gamma-1} \exp[-\lambda^\gamma (t-G)^\gamma] \quad (12)$$

$$h(t) = \lambda^\gamma \gamma (t-G)^{\gamma-1} \quad (13)$$

Além das distribuições exponenciais e Weibull há também outras distribuições utilizadas como modelos paramétricos a exemplo do modelo log-normal e a distribuição log-logística. A Tabela 2.9 mostra todas estas duas novas distribuições com os modelos já discutidos e as respectivas médias e variância destas distribuições.

Tab. 2.9 - Modelos Paramétricos da Análise de Sobrevida (LEE e WANG, 2006).

Modelo	Equações do modelo	Média e variância da distribuição
Exponencial	$S(t) = \exp[-\lambda \cdot (t-G)]$ $f(t) = \lambda \exp[-\lambda \cdot (t-G)]$ $h(t) = \lambda$	$\mu = 1/\lambda + G$ $\sigma^2 = 1/\lambda^2$
Weibull	$S(t) = \exp[-\lambda^\gamma (t-G)^\gamma]$ $f(t) = \lambda^\gamma \gamma (t-G)^{\gamma-1} \exp[-\lambda^\gamma (t-G)^\gamma]$ $h(t) = \lambda^\gamma \gamma (t-G)^{\gamma-1}$	$\mu = G + 1/\lambda \Gamma(1+1/\gamma)$ $\sigma^2 = 1/\lambda^2 [\Gamma(1+2/\gamma) + \Gamma^2(1+1/\gamma)]$
Log-logístico	$S(t) = 1 / (1 + \alpha t^\gamma)$ $f(t) = \alpha \gamma t^{\gamma-1} / (1 + \alpha t^\gamma)^2$ $h(t) = \alpha \gamma t^{\gamma-1} / (1 + \alpha t^\gamma)$	$\mu = \pi / (\alpha^\gamma \gamma \cdot \text{sen}(\pi/\beta))$ $\sigma = 1/\lambda^2$
Gompertz	$S(t) = \exp\{\lambda / \gamma \cdot [1 - \exp(\gamma t)]\}$ $f(t) = \lambda \exp(\gamma \cdot t) \exp\{\lambda / \gamma \cdot [1 - \exp(\gamma t)]\}$ $h(t) = \lambda \exp(\gamma t)$	$\mu = [\ln(\lambda / \gamma) + I] / \lambda$ com $I = 0,572217$ $\sigma = \pi^2 / (6\gamma^2)$ Obs: não há solução analítica, μ e σ são valores aproximados

2.8.4 - Análise de Sobrevida segundo modelos não-paramétricos

Na análise não paramétrica é feito o ajuste das sobrevidas sem a utilização de modelos. A sobrevida é calculada pelo produto das probabilidades de vida associada ao total de dados presentes em cada instante. O produto das probabilidades é explicado pelo fato de que para que um conjunto de dados represente células vivas ou não perda de característica em um dado instante, é necessário que estes dados mantenham suas características em todos os instantes que antecedem o momento atual. Sendo que este total varia em decorrência de mortes ou perdas em cada instante.

Assim em um conjunto de k observações $(n_1, d_1, t_1), (n_2, d_2, t_2), \dots, (n_k, d_k, t_k)$ se t_1, t_2, \dots, t_k representam os tempos, n_1, n_2, \dots, n_k representam a população e d_1, d_2, \dots, d_k representam as morte ou perda das características tem-se:

$$S_k = (n_1 - d_1)/n_1 * (n_2 - d_2)/n_2 * \dots * (n_k - d_k)/n_k$$

Sendo S_k a sobrevivência associada ao tempo t_k .

Um dos métodos que utiliza esta abordagem é o estimador de Kaplan-Meier.

2.9 - Distribuições de Weibull

Uma generalização da distribuição exponencial ou modelo de primeira ordem foi feita por Waloddi Weibull (1951) na descrição de problemas nos quais a taxa de falha, $h(t)$, pode assumir diferentes formas que vão de um comportamento decrescente a crescente. No modelo de Weibull a função densidade, $f(t)$, função falha, $h(t)$, e falha acumulada $H(t)$ são descritas pelas Equações (14), (15) e (16) nos quais o parâmetro η é conhecido como vida característica ou parâmetro de escala e o parâmetro β é dito parâmetro de forma.

$$f(t) = \frac{\beta}{t} \left(\frac{t}{\eta} \right)^{\beta} e^{-\left(\frac{t}{\eta} \right)^{\beta}} \quad (14)$$

$$H(t) = \left(\frac{t}{\eta} \right)^{\beta} \quad (15)$$

$$h(t) = \frac{\beta}{\eta} \left(\frac{t}{\eta} \right)^{\beta-1} = \frac{\beta}{t} \left(\frac{t}{\eta} \right)^{\beta} \quad (16)$$

Para ilustrar a grande variação de formas possíveis tem-se a Figura 2.22 que apresenta a taxa de morte ou falha em função do tempo t , para diferentes valores dos parâmetros do modelo (η e β) e a Figura 2.23 que apresenta a função densidade.

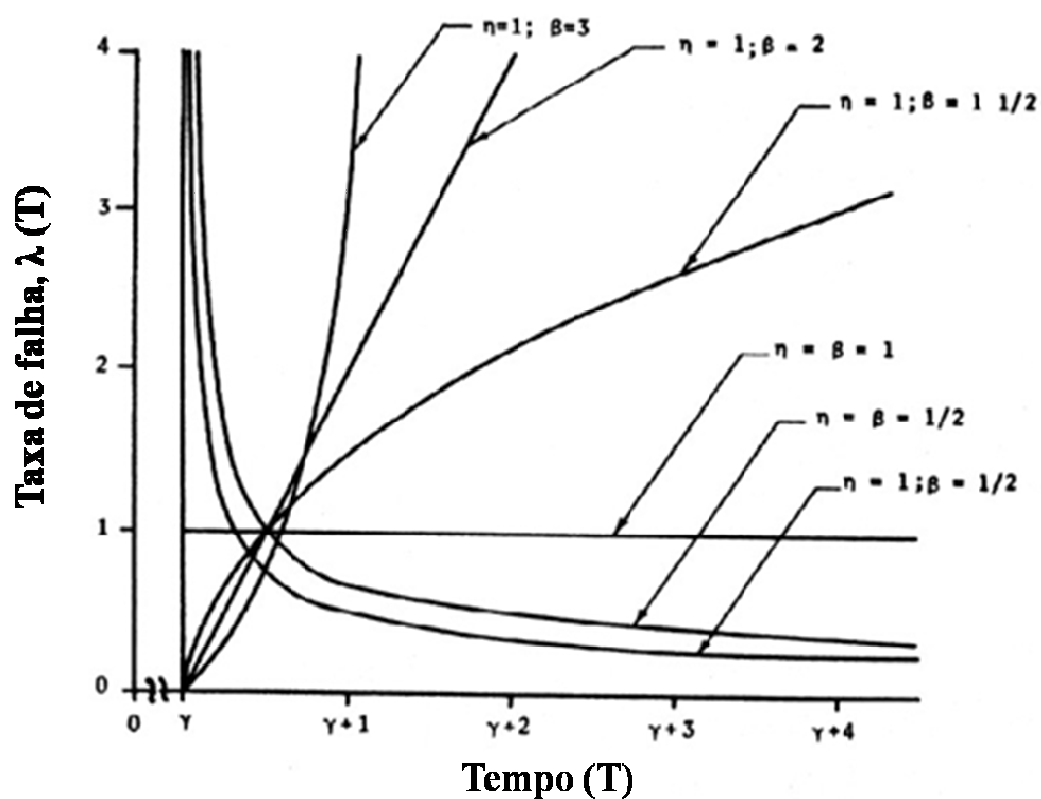
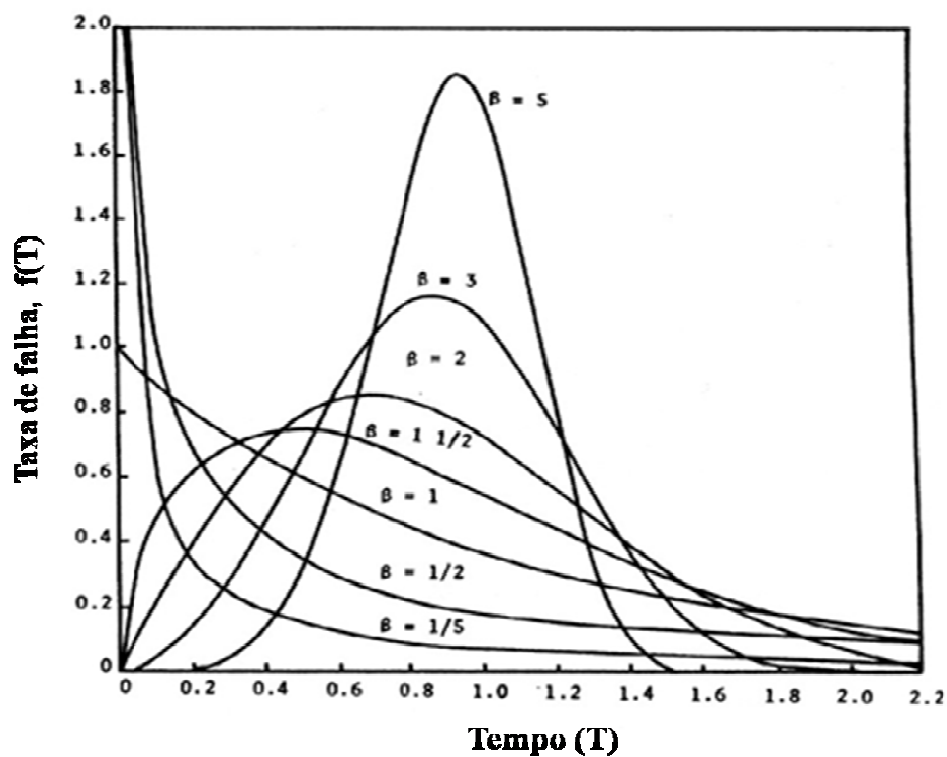


Fig. 2.22- Taxa de falha descrita pelo modelo Weibull.

Fig. 2.23 – Função densidade na distribuição de Weibull para vários parâmetros de forma β

Em estudos práticos deste modelo há um especial interesse no parâmetro de forma β , pois o mesmo pode ser utilizado nas análises de qualidade e vida útil de células. Em particular $\beta > 1$ representa uma situação na qual há um prolongamento de vida por algum efeito protetivo e para $\beta < 1$ há morte prematura. A tabela 2.10 resume as figuras 2.22 e 2.23 em termos dos valores de η e β , deve ser dado especial interesse

Tab. 2.10 - Comportamento das funções densidade de probabilidade taxa de falha

Parâmetro de forma β	Função densidade de probabilidade $f(t)$	Taxa de Falha $h(t)$
$0 < \beta < 1$	Decresce exponencialmente até ∞	Decresce
$\beta = 1$	Decresce exp. com $\frac{1}{\eta} = \lambda$	Constante $\frac{1}{\eta} = \lambda$
$\beta > 1$	Cresce até um pico e decai	Crescente
$\beta = 2$	Distribuição de Rayleigh	Cresce linearmente
$3 \leq \beta \leq 4$	Tem forma de distribuição Normal	Cresce rapidamente
$\beta > 10$	Forma de distribuição Normal	Cresce muito rapidamente

Pela variedade de usos que o modelo Weibull apresenta, o mesmo se encontra disponível em vários softwares. Sendo que o ajuste deste modelo a dados experimentais, pelas dificuldades associadas as característica não lineares do modelo, normalmente é feito pelo método de máxima verossimilhança. Na linguagem R a biblioteca “survival” possui a regressão de análise de sobrevivência conforme mostra o Apêndice A que representa a utilização desta análise aplicada aos resultados experimentais desta dissertação.

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Materiais

- Leite desnatado em pó Molico® (Nestlé)
- Cultura láctica contendo, *L. acidophilus* La-5 (1×10^6 UFC/g).
- Creme de leite UHT Mococa
- Carboximetilcelulose sódico, CMC Mix.
- Preparação espessante contendo, açúcar, goma guar e carboximetilcelulose
- Polvilho de mandioca doce Maniva
- Alginato de sódio Netec Químicas Finas LTDA
- Ácido ascórbico Merck
- Cloreto de Cálcio Dinâmica
- Cera de abelha
- Composto de cera contendo cera de abelha e parafina de proporção desconhecida dos constituintes.
- Sacarose
- Leite pasteurizado padronizado tipo “C”

3.2 - Métodos

3.2.1 - Preparo das culturas lácticas

3.2.1.1 – *Preparo da fermentação*

O meio de cultura padrão utilizado para a fermentação foi o caldo MRS - Man, Rogosa e Sharpe (MERCK, 1992/93) esterilizado (Tabela 3.1), com a seguinte composição:

Tab. 3.1 - Composição do meio de cultura caldo MRS (Man, Ragosa, Sharpe) (De Man *et al.* 1960)

Componentes	Quantidade
Peptona bacteriológica	10 g
Extrato de carne	10 g
Extrato de levedura	5g
D-glicose	20 g
Tween-80	1 g
Fosfato de potásio	2 g
Acetato de sódio	5 g
Citrato de tri-amônio	2 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,2 g
MnSO ₄ .4 H ₂ O	0,05 g
Água destilada	1000 mL

Misturaram - se todos os ingredientes, ajustou-se o pH a 6,5 utilizando NaOH 0,1N e HCl 0,1N e esterilizou - se em autoclave a 121°C por 15 minutos.

3.2.1.2 Plaqueamento

O meio de cultura padrão para plaqueamento utilizado foi o meio MRS - Man, Rogosa e Sharpe (MERCK, 1992/93) esterilizado (Tabela 3.2), com a seguinte composição:

Tab. 3.2 - Composição do meio de cultura Agar MRS (Man,Ragosa,Sharpe) (De Man *et al.* 1960)

Componentes	Quantidade
Peptona bacteriológica	10 g
Extrato de carne	10 g
Extrato de levedura	5g
D-glicose	20 g
Tween-80	1 g
Fosfato de potásio	2 g
Acetato de sódio	5 g
Citrato de tri-amônio	2 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,2 g
MnSO ₄ .4 H ₂ O	0,05 g
Água destilada	1000 mL
Agar	18 g

3.2.2 - Formulações sólidas utilizadas

No estudo foram utilizadas 18 formulações contendo alginato, creme de leite e cera assim como os aditivos ácido ascórbico, sacarose, goma xantana, amido de mandioca e

carboximetilcelulase como mostra a Tabela 3.3 e 3.4. A escolha destes constituintes de formulações e aditivos baseou no fato que os mesmos são facilmente obtidos em grau alimentícios.

Tab. 3.3 - Composição das formulações utilizadas nas preparações sólidas para 100 mL de água destilada

Formulações	Ingredientes	Quantidades
A1	Alginato de sódio	0,943%
	Amido de mandioca	4,713%
	Ácido ascórbico	0,0943%
A2	Alginato de sódio	0,943%
	Amido de mandioca	4,717%
A4	Alginato de sódio	0,901%
	Amido de mandioca	4,505%
	Creme de leite	4,505%
A9	Alginato de sódio	0,939%
	Amido de mandioca	4,695%
	Ácido ascórbico	0,469%
A10	Alginato de sódio	0,935%
	Amido de mandioca	4,673%
	Ácido ascórbico	0,935%
B5	Creme de leite	8,696%
	Amido de mandioca	11,304%
	CMC	1,739%
B6	Creme de leite	8,688%
	Amido de mandioca	11,295%
	CMC*	1,738%
	Ácido ascórbico	0,087%
B7	Creme de leite	8,688%
	Amido de mandioca	11,295%
	Preparação espessante**	1,738%
	Ácido ascórbico	0,087%
B8	Creme de leite	8,696%
	Amido de mandioca	11,304%
	Preparação espessante	1,739%

Nota: * CMC - Carboximetilcelulose

** Açúcar, espessante goma guar, carboximetil celulose.

Tab. 3.4 - Composição das formulações utilizadas nas preparações sólidas para 44 gramas

Formulações	Ingredientes	Quantidades
C1	Cera de abelha	75%
	Bactéria úmida	25%
C2	Cera de abelha	75%
	Bactéria seca 3 h	25%
C3	Cera de abelha	75%
	Bactéria seca 24 h	25%
C5	Cera de abelha	68,18%
	Bactéria seca 3 h	22,73%
	Sacarose	9,09%
C6	Cera de abelha	68,18%
	Bactéria seca 24 h	22,73%
	Sacarose	9,09%
C8	Composto de cera**	75%
	Bactéria seca 3 h	25%
C10	Composto de cera	68,18%
	Bactéria úmida	22,73%
	Sacarose	9,09%
C11	Composto de cera	68,18%
	Bactéria seca 3 h	22,73%
	Sacarose	9,09%

Nota: ** Cera de abelha e parafina com proporção desconhecida dos constituintes.

3.2.3 - Preparo das formulações utilizando alginato e creme de leite

- Pesaram-se todos os ingredientes das formulações;
- Em frascos béquer de 250 mL foi diluído o amido e alginato de sódio, (utilizado em algumas formulações, Tab. 3.3), em 100 mL de água destiladas e aquecidos ate que o mesmo estivesse todo dissolvido em consistência de gel;

- Resfriou-se e acrescentado os demais ingredientes e a bactéria e homogeneizou-se;

Nas formulações que continham alginato de sódio foi gotejado com uma seringa e agulha em uma solução contendo 0,2 M CaCl_2 com agitação mecânica até que se formasse as células imobilizadas, estas foram separadas através de uma peneira, retirada um grama da amostra para a viabilidade celular e o restante foi secas em vidro de relógio em uma estufas a uma temperatura de $43 \pm 1^\circ\text{C}$ com circulação de ar forçada, por 24 horas. Em seguida foi retirado um grama da amostra para fazer a viabilidade celular. O restante da amostra foi dividido em duas partes que foram armazenadas em embalagens plásticas fechadas parte a temperatura ambiente e parte sob refrigeração.

As formulações que não utilizavam alginato de sódio, da mistura homogeneizada retiraram-se um grama da amostra para a viabilidade celular e o restante da amostra foi espalhado em vidro de relógio invertido e seco em estufa (Figura 3.1) a uma temperatura de $43 \pm 1^\circ\text{C}$ com circulação de ar forçada, por 24 horas. Após seca a amostra retirou-se um grama para fazer a viabilidade celular e o restante armazenou-as em embalagens plásticas fechadas parte da amostra a temperatura ambiente, parte na geladeira para amostragem posterior.

3.2.4 - Preparo das formulações utilizando ceras de abelha e composto de cera

- Pesou-se 30 g de cada cera em 12 frascos de Béquer, deste total 6 Béquer com cera de abelha e 6 Béquer com composto de cera;
- Pesou-se também 6 Béquer com 4 g de sacarose em cada.
- As bactérias foram fermentadas e secadas conforme descrito anteriormente (item 3.2.5.2 e 3.2.9).
- Aqueceram-se os béqueres a uma temperatura de $60 \pm 5^\circ\text{C}$ até que a cera derretesse por completo;
- Esfriou-se até uma temperatura de $45 \pm 1^\circ\text{C}$;
- Adicionou-se a bactéria já centrifugada (úmida) nas composições C1 e C10 (Tab. 3.4), seca por 3 horas nas composições C2, C5, C8 e C11 (Tab. 3.4) e seca por 24 horas nas composições C3 e C6 (Tab. 3.4);
- Adicionou-se sacarose nas composições C5, C6, C10 e C11;
- Homogenizou-se e colocaram-se estes em formas plásticas para modelar, deixando as mesmas esfriar e endurecer.

Retirou-se um grama de cada formulação que foi ralada em ralo grosso para a análise da viabilidade celular, e o restante das amostras foi armazenada em embalagens plásticas fechadas a temperatura ambiente. A viabilidade celular foi feita nos tempos 2, 4, 10 e 18 dias de armazenamento.

3.2.5 - Condições de fermentação

3.2.5.1 *Pré – inoculo*

Foram utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultura caldo MRS. Em cada frasco foi inoculado um sachê de células de *Lactobacillus*

acidophilus LA 5 (obtidas por secagem de células liofilizadas de lactobacilos presentes em produto comercial de cultura mista Lacto-Pró). Os frascos foram incubados em reator Erlemeneyer com agitação em incubador rotativo a 30 °C, agitação de 300 rpm na concentração celular de 10^6 células/L em meio MRS (SANTOS, 2007) por 24 horas.

3.2.5.2 Fermentação meio MRS

Alíquotas de 25 mL do pré-inóculo foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 250 mL de meio de cultura caldo MRS. Os frascos foram novamente incubados a 30°C, com agitação de 300 rpm e a produção de *L. acidophilus* foi determinada após 48 horas de fermentação. A massa celular foi removida por centrifugação a 10000 rpm, por 15 minutos e 26°C, descartando-se o sobrenadante.

As bactérias obtidas pela fermentação foram centrifugadas e utilizadas da seguinte maneira:

- Foram adicionadas as formulações na quantidade de 100 mL de massa centrifugada para todas as formulações (Tab. 3.4);
- Foram secadas em estufa a uma temperatura de $43 \pm 1^\circ\text{C}$ com circulação de ar forçada por 24 horas e armazenadas em embalagens plásticas fechadas à temperatura ambiente para avaliar a viabilidade celular;
- Foram plaqueadas para a contagem de células viáveis.

3.2.5.3 Fermentação leite padronizado

Foi realizada a fermentação das células em leite pasteurizado comercial, aquecido um litro de leite a 45°C inoculado com um sachê de *L. acidophilus* LA transferido o conteúdo na mesma proporção para dois frascos de Erlenmeyers de 500 mL esterilizados a 121°C por 20 minutos e inoculando em reator Erlemeneyer com agitação em incubador rotativo a 30 °C, agitação de 300 rpm na concentração celular de 10^6 células/L em leite no tempo de 24, 26 e 48 horas.

Após a fermentação um dos frascos de Erlenmeyers foi feito a amostragem para contagem de células viáveis e armazenado na geladeira para amostragens posterior.

O fermentado do outro frasco de Erlenmeyers foi centrifugação a 10000 rpm, por 15 minutos e 26°C, descartando-se o sobrenadante. A massa celular foi espalhada em vidro de relógio invertido e seco em estufa a uma temperatura de $43 \pm 1^\circ\text{C}$ com circulação de ar

forçada, por 24 horas. Após secas retirou-se amostra para identificar a viabilidade celular e armazenada em embalagens plásticas fechadas a temperatura ambiente para amostragem posterior.

3.2.6 - Viabilidade dos micro-organismos

A avaliação da viabilidade dos micro-organismos componentes da cultura láctica nas amostras de leites fermentados seco e armazenado na geladeira, células imobilizadas, células centrifugadas úmida e células centrifugadas secas foram feitas após 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 dias de preparo, a partir de diluições decimais seriadas.

As diluições decimais seriadas consistiu na transferência de um grama da amostra de forma asséptica para um tubo de ensaio estéril contendo 9 mL de água peptonada 0,1%. Esta solução foi agitada vigorosamente e, em seguida, foram feitas as diluições subsequentes utilizando-se o mesmo diluente e inoculações por profundidade em meios seletivos (MRS) para a contagem dos micro-organismos. O resultado foi multiplicado pela recíproca da diluição e valor expresso em unidades formadoras de colônias por mililitro – UFC/mL.

O tratamento para obtenção das células imobilizadas está representado mediante fluxograma do tratamento na (Figura 3.1).

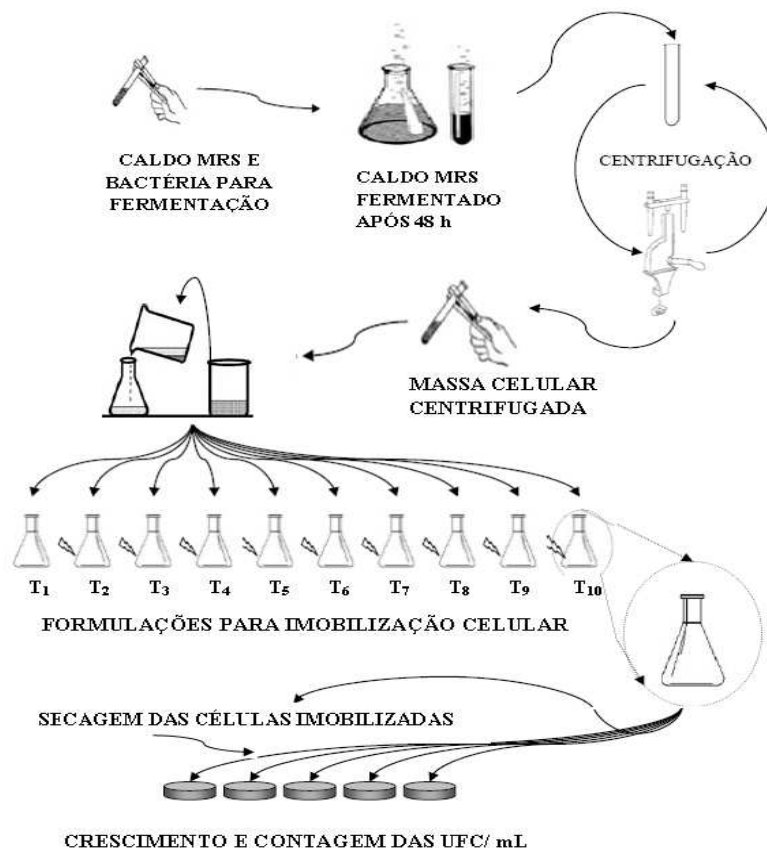


Fig. 3.1 - Fluxograma do tratamento para obtenção de células imobilizadas

3.2.7 - Determinação de umidade das amostras

Para a determinação do teor de umidade, das amostras das formulações, bactéria, leite fermentado antes e após secos, foi pesado em Béquer seco em estufa por 24 horas a $104 \pm 1^\circ\text{C}$, adicionados 5 ± 1 grama de amostra e colocadas em estufa a $104 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após este período foram retiradas da estufa e colocadas em dessecador e novamente pesadas. Para obter a umidade foi feito o cálculo em base úmida:

$$\% \text{ Umidade}(\text{Base Úmida}) = \left[\frac{(\text{Peso (bequer)}) + (\text{Peso (amostra)}) - (\text{Peso (final seco)})}{(\text{Peso (amostra)})} \right] * 100 \quad (1)$$

Também foram feitos os cálculos em base seca

$$\% \text{ Umidade}(\text{Base Seca}) = \left[\frac{(\text{Peso (bequer)}) + (\text{Peso (amostra)}) - (\text{Peso}(\text{final seco}))}{(\text{Peso (final seco)}) - (\text{Peso (bequer)})} \right] * 100 \quad (2)$$

3.2.8 - Estudo da secagem de amostras

Para o estudo da secagem das amostras das formulações, bactéria e leite fermentado e centrifugado, foram retiradas amostras antes de colocar na estufa (amostra úmida), a uma temperatura de $43 \pm 1^\circ\text{C}$ com circulação de ar forçada, nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 24 horas de secagem para análise de umidade e viabilidade celular.

3.2.9 – Estudo do crescimento de fungos, alteração de cor e aparência

Todas as formulações foram armazenadas a temperatura ambiente por seis meses e a cada mês de armazenamento eram feitas análise visual para observar o crescimento de fungos, alteração de cor e aparência nas mesmas.

3.2.10 – Estudo da Análise de Sobrevivência

Para o estudo a Análise de Sobrevivência foi utilizada o modelo de Weibull com as seguintes equações:

$$f(t) = \frac{\beta}{t} \left(\frac{t}{\eta} \right)^{\beta} e^{-\left(\frac{t}{\eta} \right)^{\beta}} \quad (3)$$

3.2.11 – Estudo da Atividade de Água (Aw)

Foi determinada utilizando o equipamento Novasina Thermoconstanter swiss made RS 232 / RTD – 200 (Switzovlond, JEB controls INC, Kirkland, QC) a temperatura de 25°C . A calibração do equipamento foi realizada utilizando soluções de sulfato de potássio, cloreto e sódio, carbonato de potássio, cloreto de magnésio e cloreto de potássio como mostra no Apêndice B.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 – Descrições da fermentação

A Figura 4.1 mostra a transformação que ocorre no meio de fermentação leite e MRS para *Lactobacillus acidophilus* LA5 com uma concentração inicial de células de 10^6 cel/mL, observada durante a fermentação para tempos de 24 e 48 horas no que se refere à contagem celular. É possível observar que o crescimento de células foi satisfatório tanto no leite como no meio MRS e que entre os tempos de 24, 26 e 48h o tempo de 24h foi o mais adequado para conduzir os ensaios, pois neste tempo a concentração celular foi maior tanto no leite quanto no MRS. A comparação entre os meios MRS e leite mostra que há uma maior produção celular para fermentação em leite, pois para 24h a concentração celular no leite é 1,9 vezes maior que a do MRS e este valor também é maior para outros tempos de ensaio.

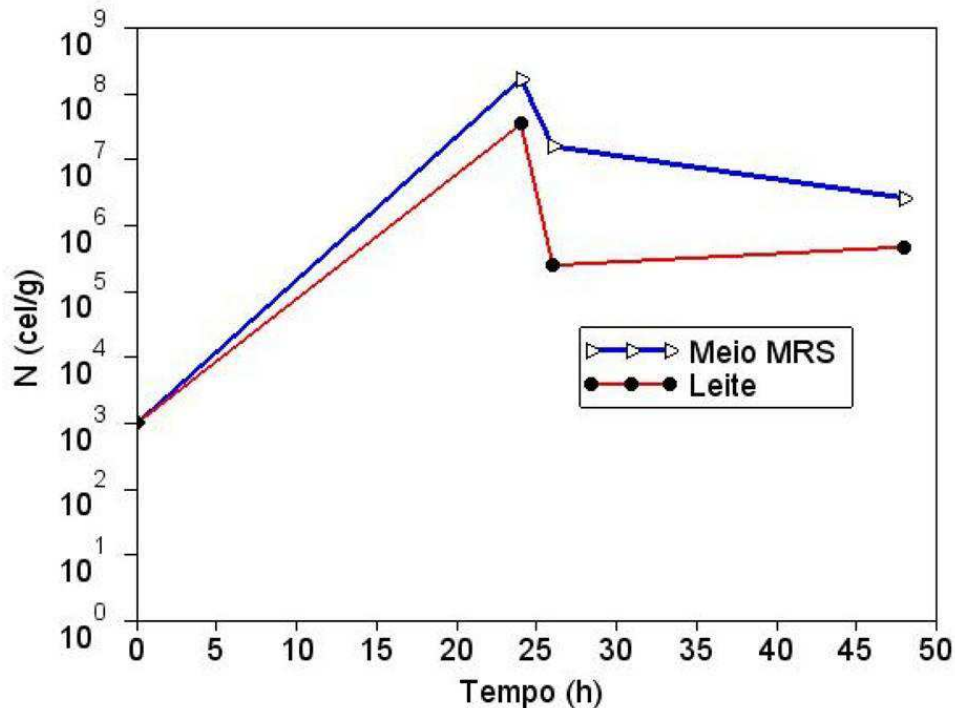


Fig. 4.1 – Crescimento celular na fermentação do leite e MRS

A Tabela 4.1 mostra a comparação das contagens obtidas tanto no leite como no meio MRS com 24 horas de fermentação e após ser centrifugada e as características que cada meio obtém após a fermentação. Pode-se concluir que o meio MRS é melhor de se trabalhar, pois as células obtidas são mais compactas e de fácil separação quando centrifugadas e a contagem celular nos tempos de 24 horas e após centrifugadas possuem a mesma ordem de grandeza. Por isso, optou-se pelo uso do meio MRS em substituição ao leite.

Tab. 4.1 – Características de fermentação do meio MRS e do leite

Formulação	Contagem 24 h	Contagem separação	Característica separação
Leite	$1,63 \times 10^7$	$7,39 \times 10^7$	Dificuldade de homogeneização pela viscosidade
Meio MRS	$8,58 \times 10^6$	$5,56 \times 10^7$	Formação de células compactas em pelet agregados

4.2 – Formulações de alginato e creme

As Figuras 4.2 e 4.3 mostram o teor de água nas formulações A1, A2, A3, A4, B5, B6, B7 e B8, antes da secagem e após a secagem com o tempo de 20 horas. Pode-se observar que há um comportamento diferente entre as formulações que levam alginato, A1 a A4 e as que não levam alginato, B5 a B8 durante a perda de água. Após a secagem as formulações que levam alginato atingiram um teor de umidade menor, próximo a 5%, do que as formulações que não contêm alginato ficaram com teor entre 12,5% e 15%, sendo que todas as formulações no início da secagem tinham o teor de umidade em torno de 90%.

O armazenamento do produto por 6 meses nas condições de umidade final mostrou ser satisfatória porque em nenhuma das formulações houve formação de fungos ou alterações da aparência do produto associadas à deterioração.

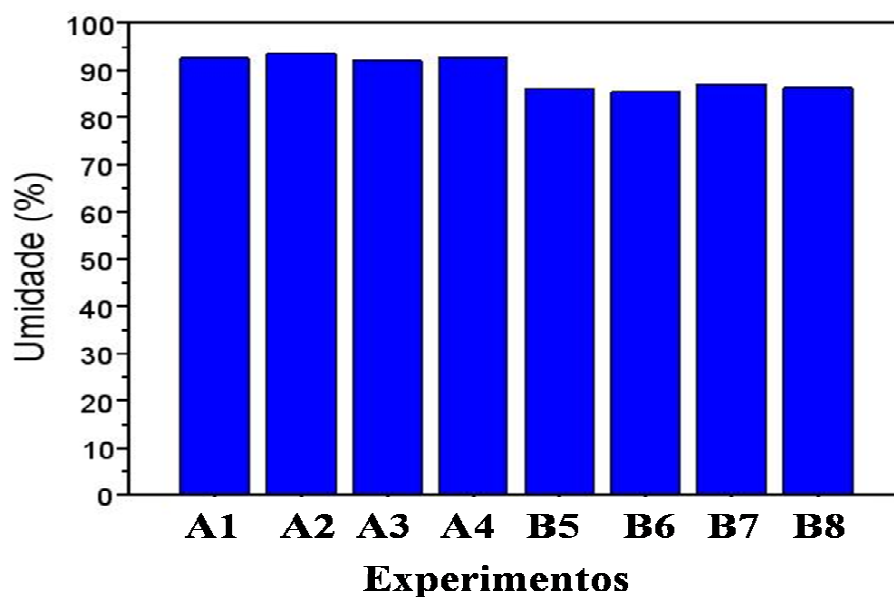


Fig. 4.2 - Umidade antes da secagem

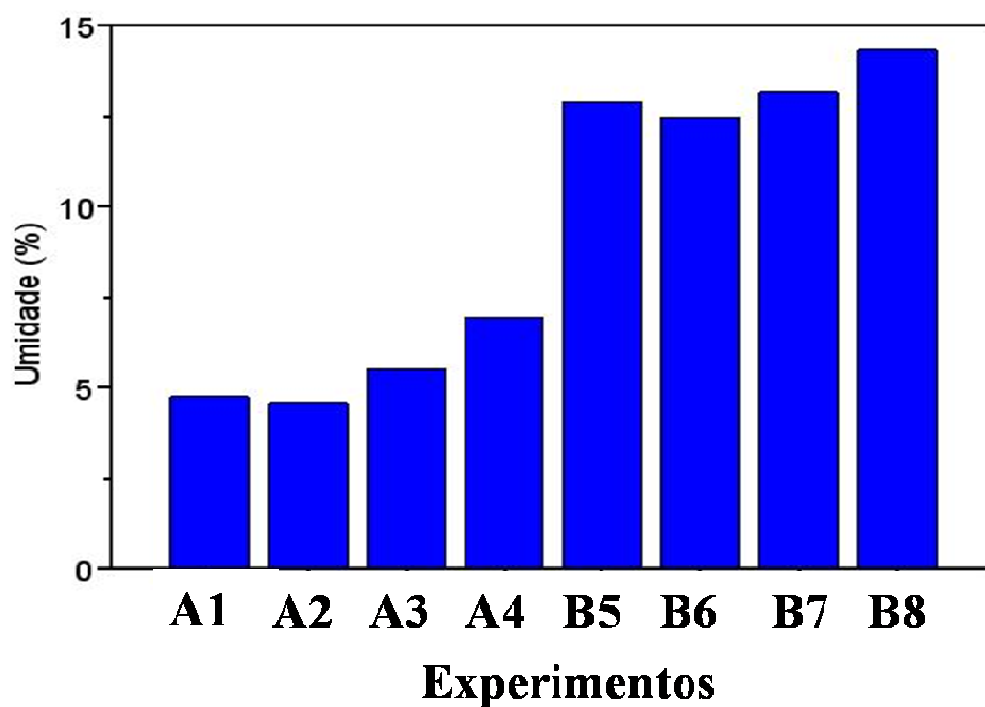


Fig. 4.3 - Umidade após a secagem

As Figuras 4.4, 4.5 e 4.6 mostram as células viáveis nas diferentes formulações de alginato e creme e a Tabela 4.2 mostra os parâmetros cinéticos k , coeficiente de correlação e

Valor D associados ao ajuste não linear destes dados aos modelos cinéticos. Pode-se observar que pelos parâmetros cinéticos, Valor D, as formulações A4 e B8 são as mais estáveis e a formulação A4 se destaca como melhor que a B8, pois quanto maior o Valor D, mais estável é a formulação. Os modelos testados representam bem os dados experimentais, como pode ser observado pelo Valor p, e R^2 (Tabela 4.2) e as Figuras 4.7 e 4.8 mostram os valores previstos e calculados pelo ajuste e os resíduos associados a estes ajustes.

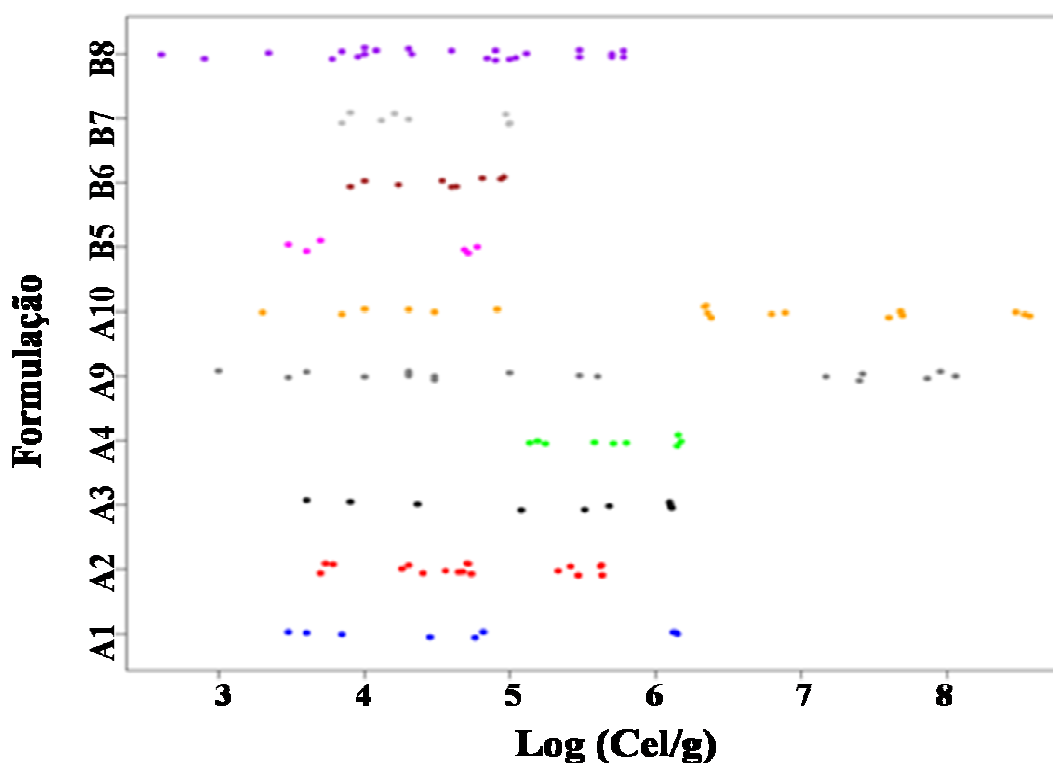


Fig. 4.4 - Resultados experimentais das contagens para diferentes formulações de alginato e creme

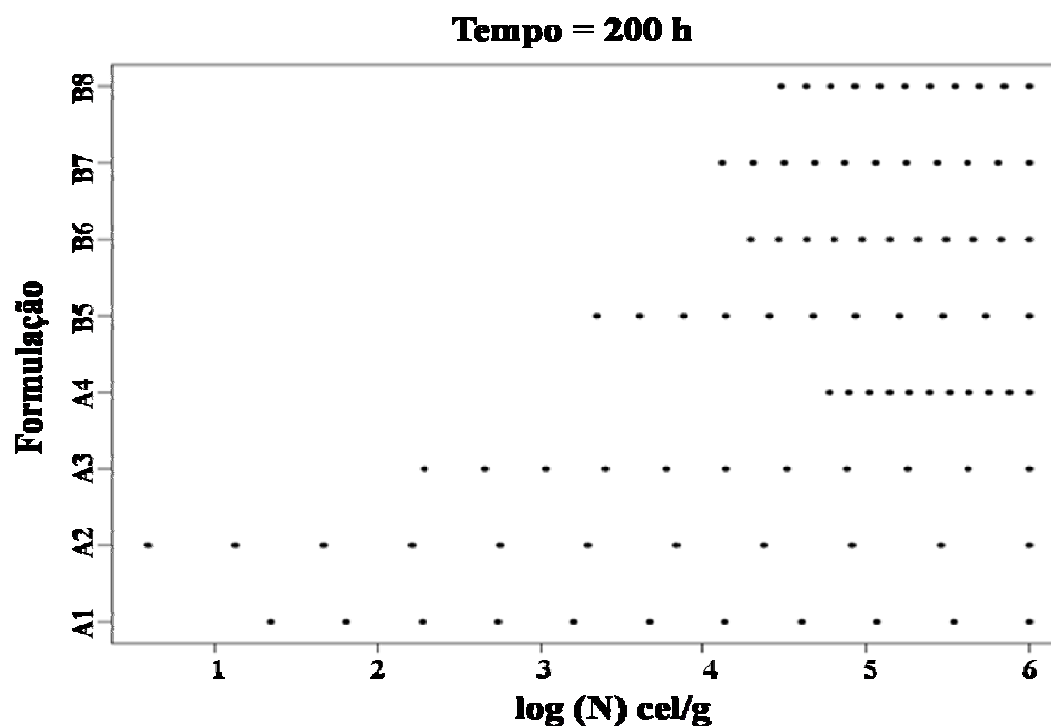


Fig. 4.5 - Resultados experimentais das contagens para diferentes formulações de alginato e creme com o tempo

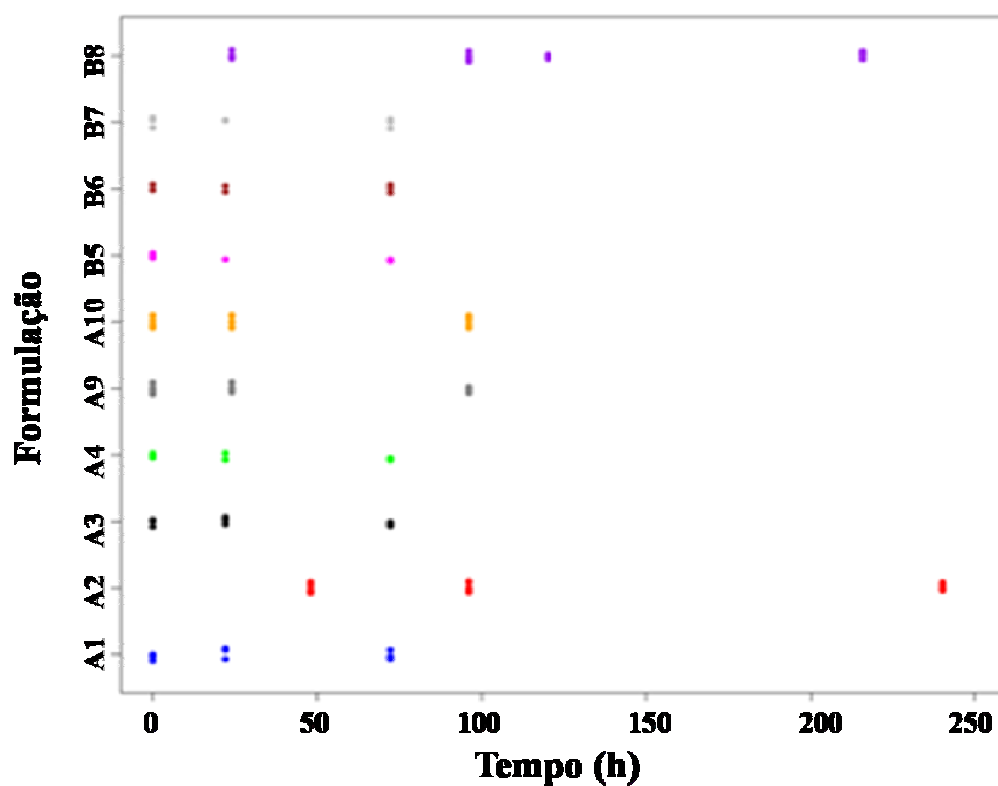


Fig. 4.6 - Tempos utilizados nas contagens para diferentes formulações de alginato e creme

Tab. 4.2 – Parâmetros Cinéticos, coeficientes de correlação e Valor D das formulações

Formulação	Ingredientes	Quantidade	D (h)	k (h ⁻¹)	R ²
A1	Aginato de sódio Amido mandioca Ácido ascórbico	0,94% 4,71% 0,09%	31,01 ± 4,17 p=1,45 e -04 t=7,44	0,032 ± 0,004 p=1,4e-04 t=7,44	0,994
A2	Aginato de sódio Amido mandioca	0,94% 4,71%	161,89 ± 31,28 p=9,2e-05 t=5,16	0,0062 ± 0,001 p=9,2e-05 t=5,18	0,992
A4	Aginato de sódio Amido mandioca Creme de leite	0,90% 4,5% 4,5%	106,98 ± 40,54 p=0,034 t=2,64	0,01 ± 0,004 p=0,034 t=2,64	0,997
A9	Aginato de sódio Amido mandioca Ácido ascórbico	0,93% 4,69% 0,46%	29,33 ± 5,01 p=2,41e-05 t=5,86	0,03 ± 0,006 p=2,41e-05 t=5,86	0,969
A10	Aginato de sódio Amido mandioca Ácido ascórbico	0,93% 4,67% 0,93%	25,45 ± 1,94 p=5,62e-10 t=13,12	0,039 ± 0,003 p=5,62e-10 t=13,12	0,993
B5	Creme de leite Amido mandioca CMC	8,69% 11,30% 1,73%	70,76 ± 26,71 p=0,057 t=2,65	0,014 ± 0,005 p=0,057 t=2,65	0,992
B6	Creme de leite Amido mandioca CMC Ácido ascórbico	8,68% 11,29% 1,73% 0,08%	85,06 ± 8,55 p=2,21e-05 t=9,95	0,012 ± 0,001 p=2,21e-05 t=9,95	0,999
B7	Creme de leite Amido mandioca Preparação espessante Ácido ascórbico	8,68% 11,30% 1,73% 0,08%	82,45 ± 22,67 p=0,01 t=3,64	0,012 ± 0,004 p=0,011 t=3,64	0,996
B8	Creme de leite Amido mandioca Preparação espessante	8,69% 11,30% 1,73%	94,54 ± 14,06 p= 9,31 e -07 t= 6,72	0,011 ± 0,0016 p= 9,31 e -07 t= 6,72	0,987

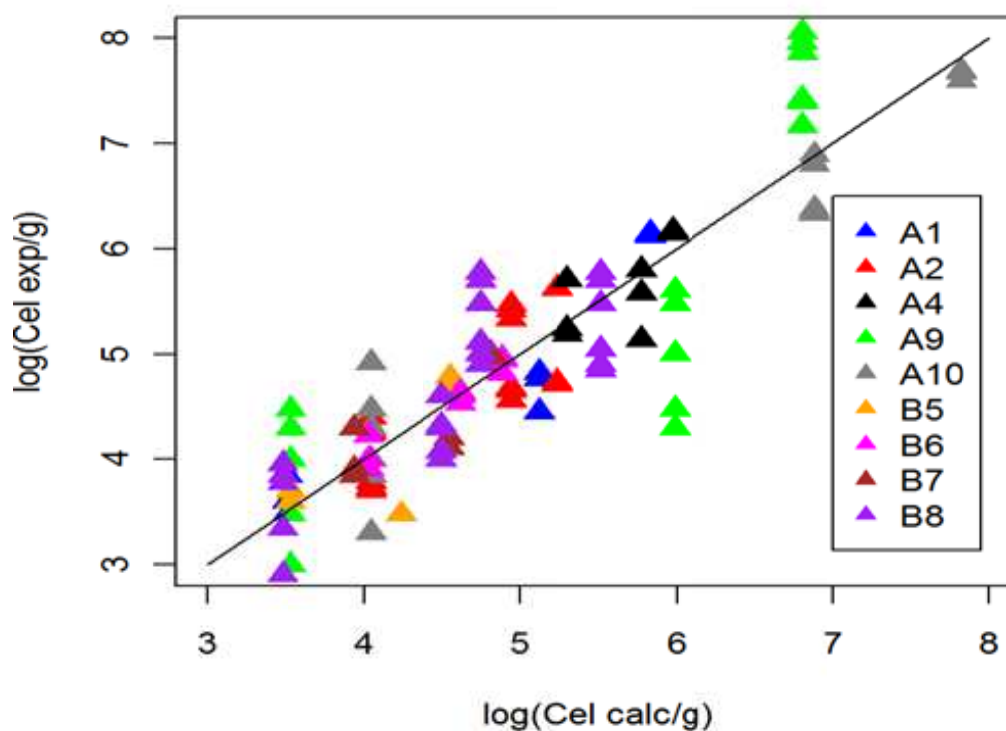


Fig. 4 7 - Resultados do valor predito e do valor calculado das formulações de alginato e creme

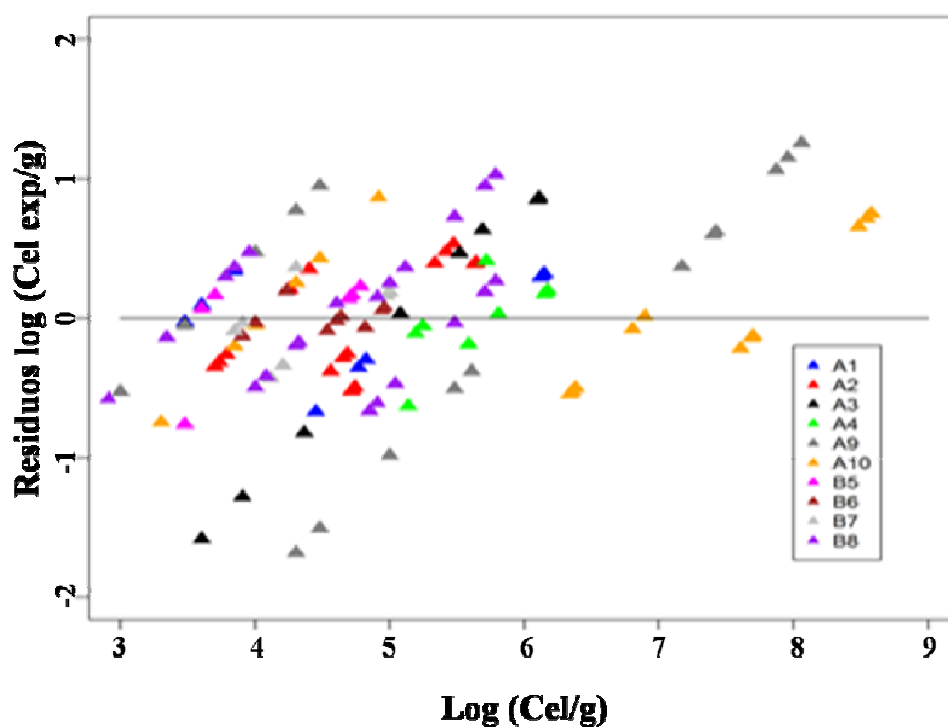


Fig. 4.8 - Resíduos associados aos ajustes das formulações de alginato e creme

Na Figura 4.9 estão representadas as esferas de alginato de cálcio na formulação que utiliza ácido ascórbico e célula imobilizada com esferas de alginato de cálcio sem ácido ascórbico, onde é possível notar uma coloração branca adquirida pelas esferas devido à presença do ácido ascórbico.



**Célula imobilizada sem Ácido
Ascórbico**

**Célula imobilizada com Ácido
Ascórbico**

Fig. 4.9 – Foto das células imobilizadas com e sem ácido ascórbico

4.3 – Formulações de Ceras de Abelha e Composto de Cera

A Tabela 4.3 mostra os parâmetros cinéticos k , coeficiente de correlação e Valor D associados ao ajuste não linear destes dados aos modelos cinéticos. Nas formulações contendo cera de abelha, de C1 a C6, o produto mais estável foi C5, ou seja, a comparação do processo de secagem ao que as células foram submetidas mostra que a secagem de 3 horas que antecede a geração do produto foi mais estável que os produtos que receberam células secas por 24 horas (C3 e C6) e células *in natura* (C1, C2 e C3). Esta estabilidade maior pode estar associada a fatores como redução de atividade de água e possíveis danos celulares associadas à secagem (FRAZIER, 1927). A comparação entre os produtos de células secas por 24 horas e células *in natura* mostra que o produto seco por 24h é mais estável que o produto *in natura*. Observou-se então que a secagem causa um efeito benéfico nas células e que tempos inferiores há 24 horas são melhores.

A comparação entre os Valores D dos ensaios sem sacarose (C1, C2, C3) e ensaios com sacarose (C5 e C6), mostram que o uso da sacarose melhora a estabilidade, o que pode

ser observado, por exemplo, comparando o Valor D dos ensaios C5 e C2: o Valor D dos ensaios são 509 e 300, respectivamente foi 1,9 vezes maior.

Comparando as formulações com composto de cera observou-se que as formulações com 3 horas foi a melhor (C11) e que as formulações com sacarose (C8) obtiveram o Valor D superior às demais, podendo-se então afirmar que a formulação C11 tem a melhor estabilidade, ou seja, a adição de parafina a cera gerou uma menor estabilidade. Comparando a formulação que utilizou cera de abelha (C1 a C6) e a que utilizou composto de cera (C8, C10 e C11), a de cera de abelha foi superior ao composto de cera.

Tab. 4.3 - Parâmetros Cinéticos, coeficiente de correlação e Valor D das formulações com cera de abelha e composto de cera

Formulação	Ingredientes	Quantidades	D (h)	k (h ⁻¹)	R ²
C1	Cera de abelha Bactéria úmida	75% 25%	161,89 ± 31,28 p=9,2e-05 t=5,18	0,006 ± 0,002 p=9,2e-05 t=5,18	0,992
C2	Cera de abelha Bactéria seca 3 h	75% 25%	300,07 ± 109,14 p= 0,02 t=2,75	0,003 ± 0,001 p=0,014 t= 2,75	0,989
C3	Cera de abelha Bactéria seca 24 h	75 % 25%	274,71 ± 101,70 p=0,016 t= 2,70	0,004 ± 0,002 p=0,016 t= 2,70	0,989
C5	Cera de abelha Bactéria seca 3 h Sacarose	68,18% 22,73% 9,09%	508,88 ± 192,04 p=0,018 t= 2,65	0,002 ± 0,001 p=0,02 t= 2,65	0,996
C6	Cera de abelha Bactéria seca 24 h Sacarose	68,18% 22,73% 9,09%	148,28 ± 21,29 p=3,19e-06 t=6,97	0,007 ± 0,001 p=3,19e-06 t=6,97	0,994
C8	Composto de cera Bactéria seca 3 h	75 % 25%	196,23 ± 40,99 p=0,002 t=4,79	0,005 ± 0,001 p=0,001 t=4,79	0,990
C10	Composto de cera Bactéria úmida Sacarose	68,18% 22,73% 9,09%	230,69 ± 46,54 p=1,43 e -04 t=4,96	0,004 ± 0,001 p=0,001 t=4,96	0,995
C11	Composto de cera Bactéria seca 3h Sacarose	68,18% 22,73% 9,09%	251,91 ± 40,34 p=15,17e-05 t=6,25	0,004 ± 0,001 p=1,17e-05 t=6,25	0,996

As Figuras 4.10, 4.11 e 4.12 mostram as células viáveis nas diferentes formulações, de cera de abelha e composto de cera.

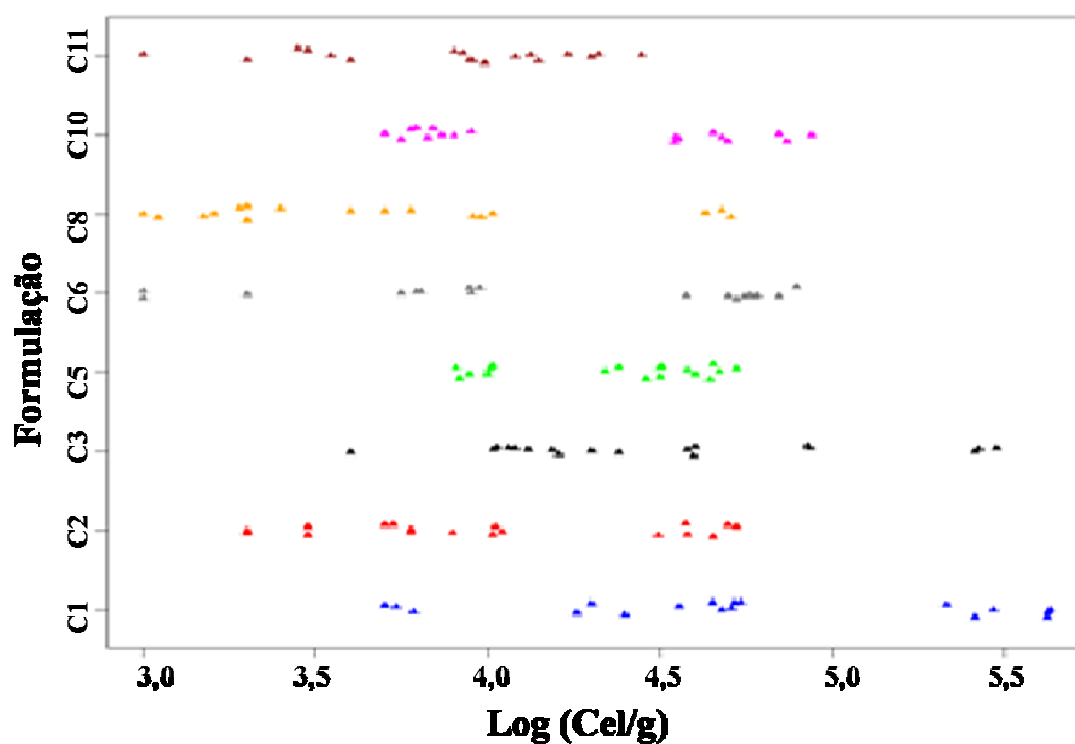


Fig. 4.10 – Resultados experimentais das contagens para diferentes formulações de cera de abelha e composto de cera

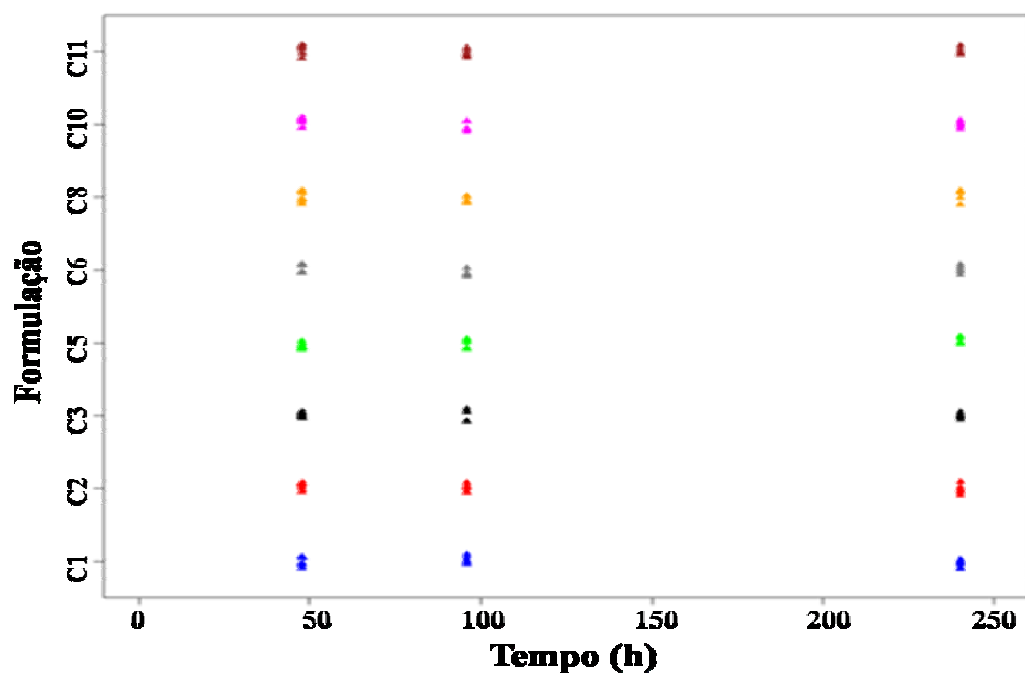


Fig. 4.11 - Tempos utilizados nas contagens para diferentes formulações de cera de abelha e composto de cera

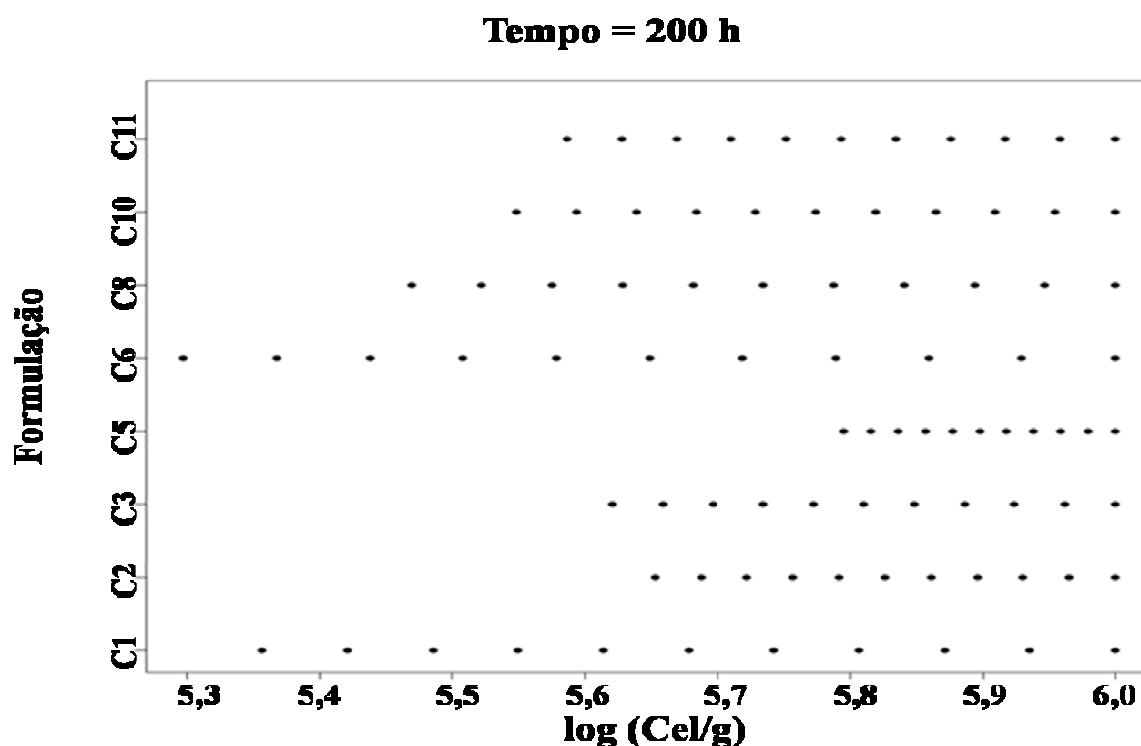


Fig. 4.12 - Resultados experimentais das contagens para diferentes formulações de cera de abelha e composto de cera com o tempo

As Figuras 4.13 e 4.14 mostram os valores previstos e calculados pelo ajuste e os resíduos associados a estes ajustes.

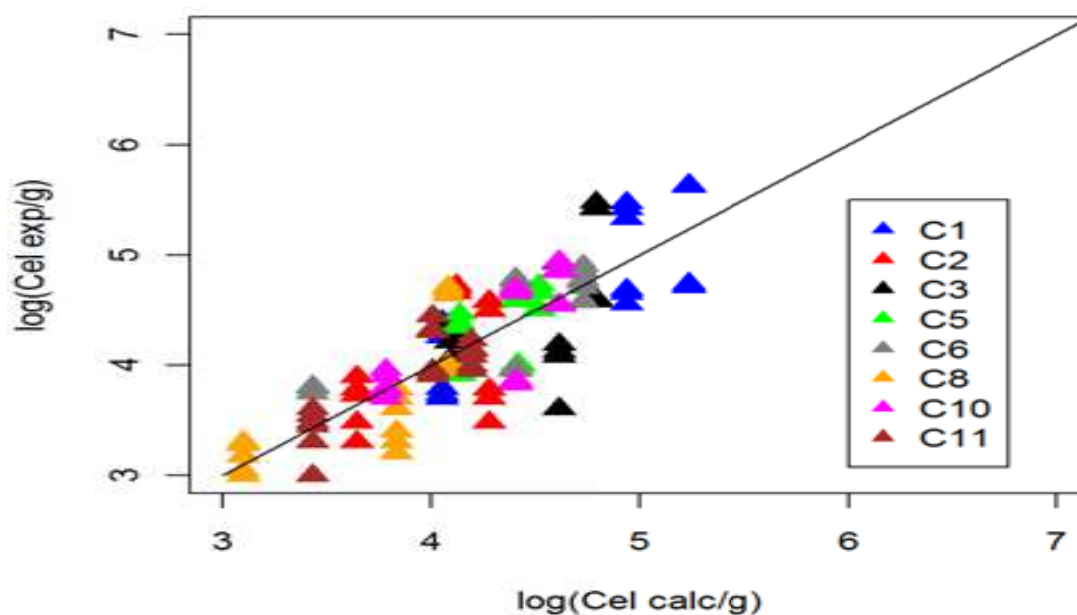


Fig. 4 13 - Resultados do valor predito e do valor calculado das formulações de cera de abelha e composto de cera

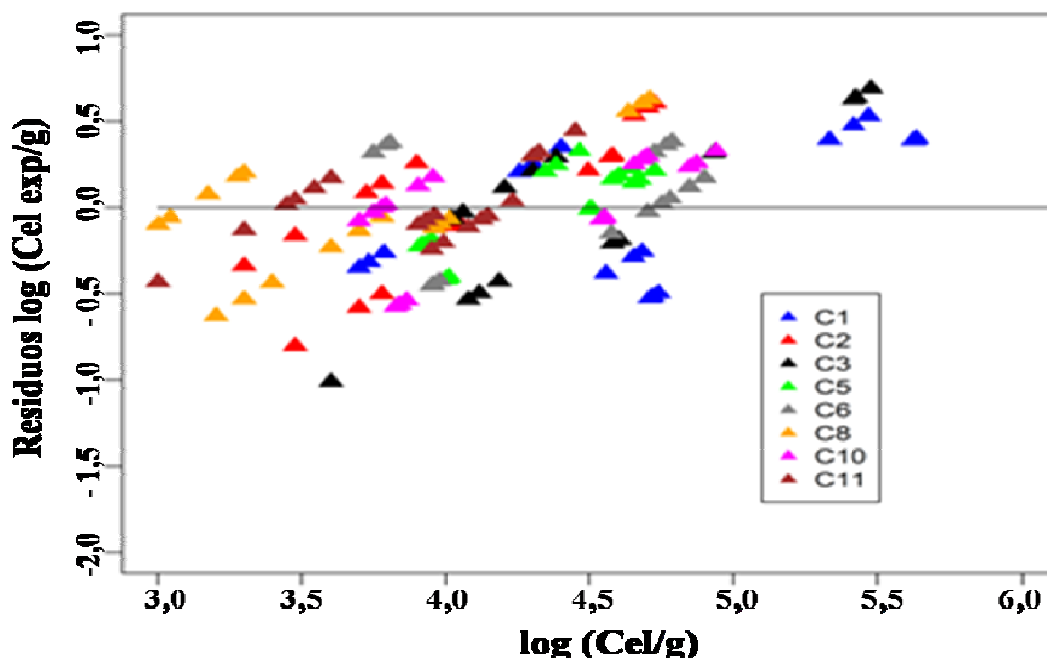


Fig. 4.14 - Resíduos associados aos ajustes das formulações de cera de abelha e composto de cera

4.4 – Análise de sobrevivência

A Tabela 4.4 mostra os parâmetros gerados no ajuste das frequências de morte associadas ao modelo de Weibull descrito pela Equação 14 que é uma forma modificada utilizada no Software na Linguagem R. Pode-se observar que todos os parâmetros foram significativos para $p < 0,055$. Pode-se concluir pelos valores dos parâmetros β apresentados na Tabela 4.4, que embora a cera, o alginato e o creme tenham tornado o produto mais estável, nenhum destes tratamentos foi capaz de gerar um efeito protetivo no sentido de reduzir a frequência de morte no início do armazenamento, o que corresponde a $\beta > 1$.

$$f(x) = \left(\frac{\beta}{\sigma}\right) \times \left(\frac{x}{\sigma}\right)^{\sigma-1} \exp\left(-\left(\frac{x}{\sigma}\right)^{\beta}\right) \quad (14)$$

Tab. 4.4 Parâmetros ajustado pelo modelo de Weibull

Formulações	β	σ	p - Valor
A1	0,20	199687,58	P<0,01
A2	0,40	154502,34	P<0,01
A3	0,15	3121,72	P<0,01
A4	0,16	2302,84	P<0,01
A9	0,24	64466,56	P<0,01
B6	0,17	5882,58	P<0,01
B7	0,22	22813,75	P<0,01
B8	0,30	50933,79	P<0,01
C1	0,64	337859,53	p<0.06
C2	0,23	8087,59	P<0,01
C3	0,24	39596,22	P<0,01
C4	0,15	1303,018	P<0,01
C5	0,17	7925,69	P<0,01
C6	0,27	48025,85	P<0,01
C7	0,36	93981,21	P<0,01
C8	0,22	27981,20	P<0,01
C10	0,27	46890,71	P<0,01
C11	0,28	55320,20	P<0,01

A Figura 4.15 é mostrada todas as curvas de função densidade expressas pelo alginato e o creme e a Figura 4.16 representa todas as formulações conjuntamente sem a identificação das mesmas. Nesta figura é possível constatar, que a maior morte celular é prematura em todas as situações, ou seja, não há efeito protetivo uma vez que não foi observado o formato de sino.

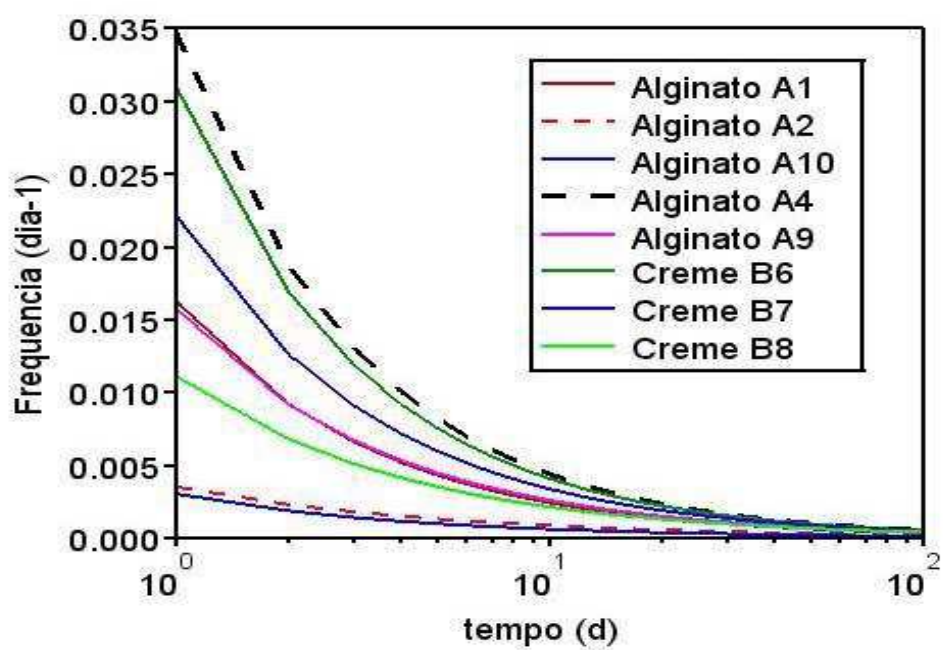


Fig. 4.15 - Curva de frequência de morte das formulações com alginato e creme

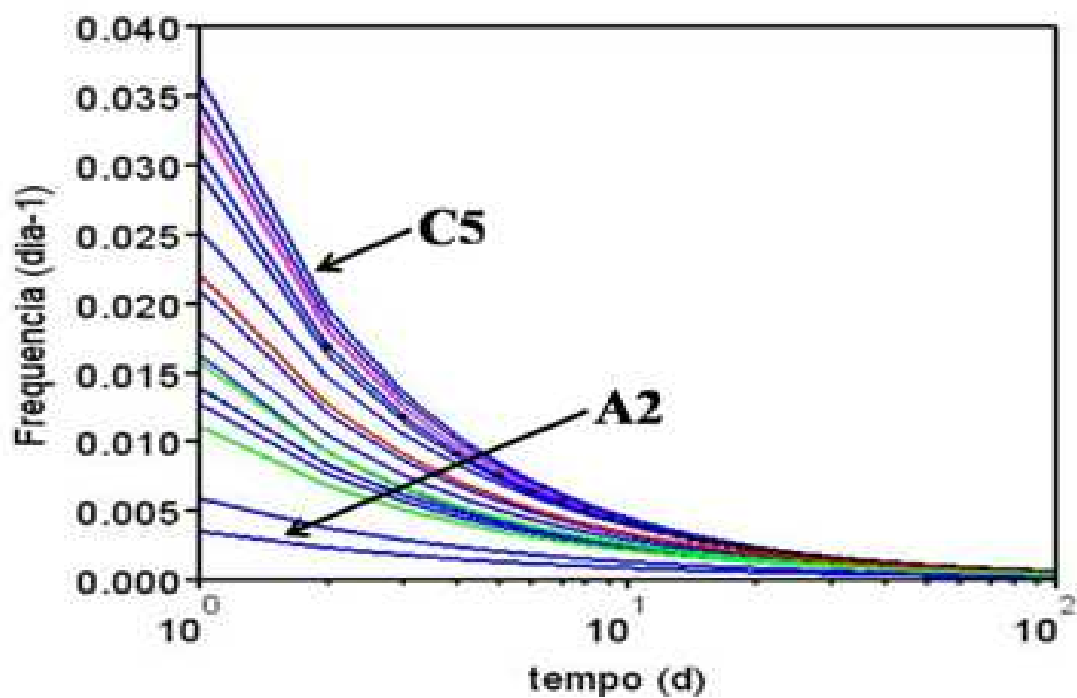


Fig. 4.16 - Curva de frequência de morte de todas as formulações

4.5 – Investigações da estabilidade

Com a intenção de investigar a estabilidade foi feito um estudo detalhado do comportamento das células durante o preparo e a avaliação das mesmas em termos de suas propriedades.

As Tabelas 4.5 e 4.6 mostram o comportamento das preparações durante seis meses de armazenamento em relação aos parâmetros crescimento de fungos e alterações de cor e consistência. Pode-se observar que as condições de preparo foram adequadas no que se refere a evitar a contaminação visível por fungos e alterações pronunciadas do produto, sendo que a alteração de cor observada correspondia ao escurecimento.

Tab. 4.5 - Crescimento de fungos

Formulações	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6
A1	---	---	---	---	---	---
A2	---	---	---	---	---	---
A3	---	---	---	---	---	---
A4	---	---	---	---	---	---
A9	---	---	---	---	---	---
B6	---	---	---	---	---	---
B7	---	---	---	---	---	---
B8	---	---	---	---	---	---
C1	---	---	---	---	---	---
C2	---	---	---	---	---	---
C3	---	---	---	---	---	---
C4	---	---	---	---	---	---
C5	---	---	---	---	---	---
C6	---	---	---	---	---	---
C7	---	---	---	---	---	---
C8	---	---	---	---	---	---
C10	---	---	---	---	---	---
C11	---	---	---	---	---	---

Legenda: - - - Ausência de fungos

- - + Presença de fungos-teste placa

- + + Contaminação externa

+ + + Contaminação interna e externa

Tab. 4.6 – Alteração de cor

Formulações	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6
A1	---	---	--+	--+	--+	--+
A2	---	---	--+	--+	--+	--+
A3	---	---	--+	--+	--+	--+
A4	---	---	--+	--+	--+	--+
A9	---	---	--+	--+	--+	--+
B6	---	---	--+	--+	--+	--+
B7	---	---	--+	--+	--+	--+
B8	---	---	--+	--+	--+	--+
C1	---	---	---	---	---	---
C2	---	---	---	---	---	---
C3	---	---	---	---	---	---
C4	---	---	---	---	---	---
C5	---	---	---	---	---	---
C6	---	---	---	---	---	---
C7	---	---	---	---	---	---
C8	---	---	---	---	---	---
C10	---	---	---	---	---	---
C11	---	---	---	---	---	---

Legenda: --- Alteração de cor e consistência não observada

--+ Alteração na cor observada

-++ Alteração de consistência observada

+++ Mudanças de todas as características

A Figura 4.17 mostra o comportamento da atividade de água. Os valores de baixa atividade de água para cera e alginato significam que é esperado para estas formulações maiores estabilidade do produto, pois valores de atividade de água menor os que 0,60 dificultam o crescimento da maioria dos micro-organismos (FRANCO; LANDGRAF, 2005). Embora os valores sugiram esta maior estabilidade, eles não são capazes de explicar a maior estabilidade das formulações de ceras comparando com as formulações com alginato.

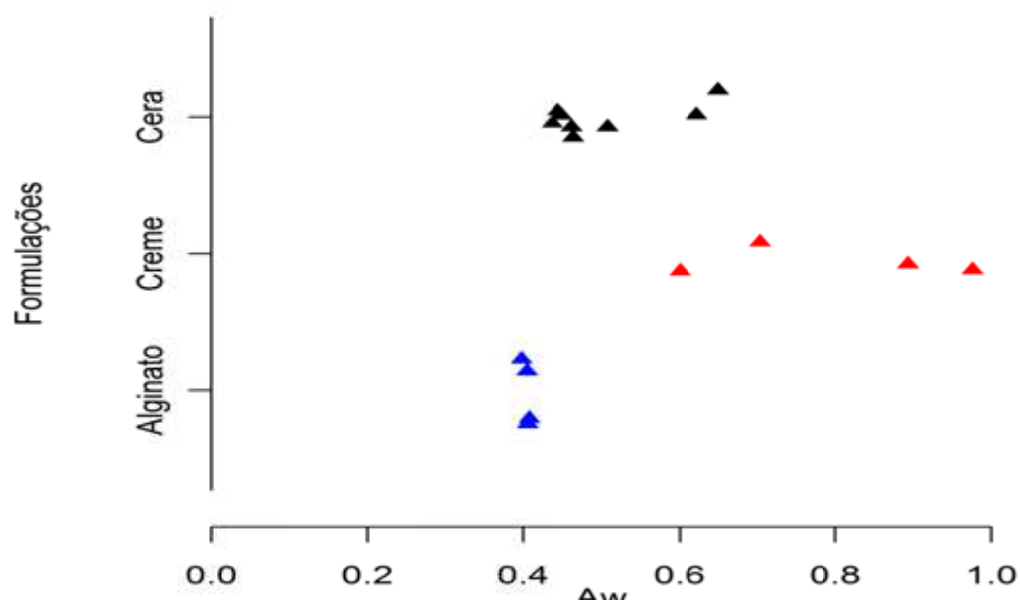


Fig. 4.17 – Comportamento da Atividade de água (A_w) de todas as formulações

A Figura 4.18 e a tabela 4.7 mostram o comportamento observado durante a secagem. Pode-se observar que nas preparações com alginato tem-se menor teor de sólido, e ainda que a perda de água ocorra de forma mais rápida, pois o valor da constante de perda de peso (K_w) é menor.

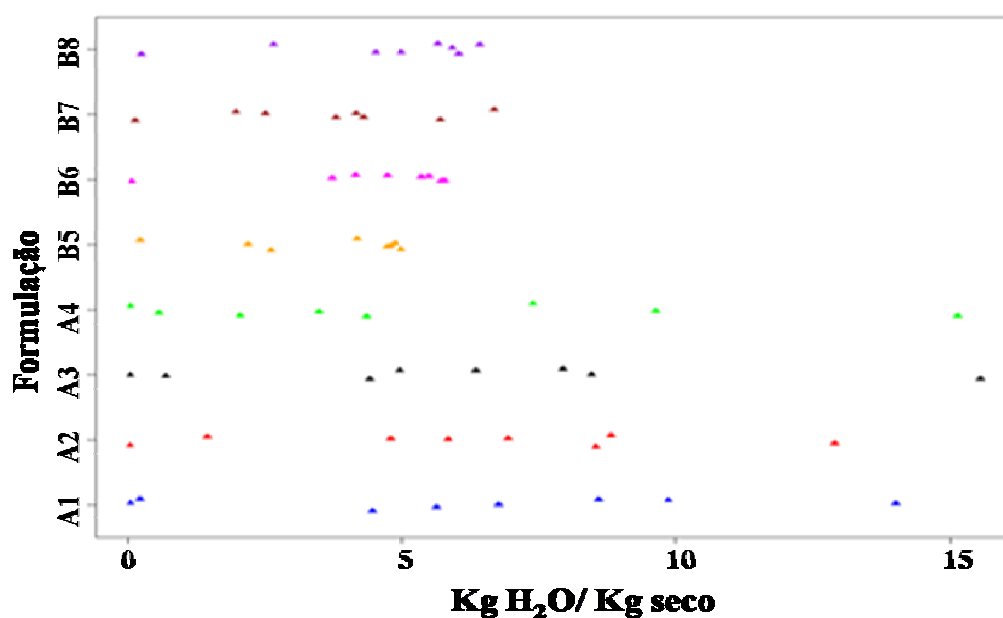


Fig. 4.18 - Umidade base seca das formulações com alginato e creme

Tab. 4.7 – Descrição da secagem nas formulações com alginato e creme

Formulação	U_0 (kg H ₂ O/kg sol)	K_w (h ⁻¹)	Umidade final do produto (g H ₂ O/100g)	Massa de sólidos antes da secagem (em 100g produto)
A1	13,52 ± 0,92 p=6,11e-06 t=1475	0,23 ± 0,03 p= 0,004 t=7,09	4,5	6,67
A2	12,18 ± 0,76 p= 3.77e-06 t=16.01	0,18 ± 0,03 p=0,001 t=7,23	3,83	7,2
A3	13,97 ± 1.21 p= 2,54e-05 t=11,55	0,26 ± 0,05 p= 0,001 t=5,73	4,025	6,05
A4	14,72 ± 0,56 p=1,99e-07 t=26,32	0,36 ± 0,03 p= 1,02e-05 t=13,52	4,451	6,2
B5	5,49 ± 0,37 p=6,29 e- 06 t=14,67	0,09 ± 0,02 p= 0,003 t= 4,899	19,09	16,73
B6	6,28 ± 0,38 p= 3,1e-06 t=16,55	0,07 ± 0,015 p= 0,003 t=4,.93	6,962	14,77
B7	6,49 ± 0,28 p=4,15e-07 t=23,25	0,15 ± 0,015 p= 7,63e-05 t=9,527	12,74	13,04
B8	6,85 ± 0,38 p= 1,77e-06 t=18,20	0,09 ± 0,015 p= 0,001 t=5,89	20,15	13,51

Nota: $U=U_0*\exp(-k_w.t)$ U e U_0 umidade inicial em final em kg H₂O/kg seco, k_w constante de perda de peso (h⁻¹)

4.6 - Avaliações completas

Comparando todas as formulações utilizadas no trabalho, Figura 4.19, pode-se observar que o uso da cera representa a situação mais estável pelos maiores valores D. A comparação entre as ceras, em relação a cera pura (barras azul Figura 4.19) mostra que a adição de parafina a cera (barras brancas, Figura 4.19) e a secagem por 24 horas (C3 e C6) da bactéria fermentada reduz a estabilidade em relação a não secagem (C1 e C10) e secagem por 3 horas (C2, C5, C8 e C11).

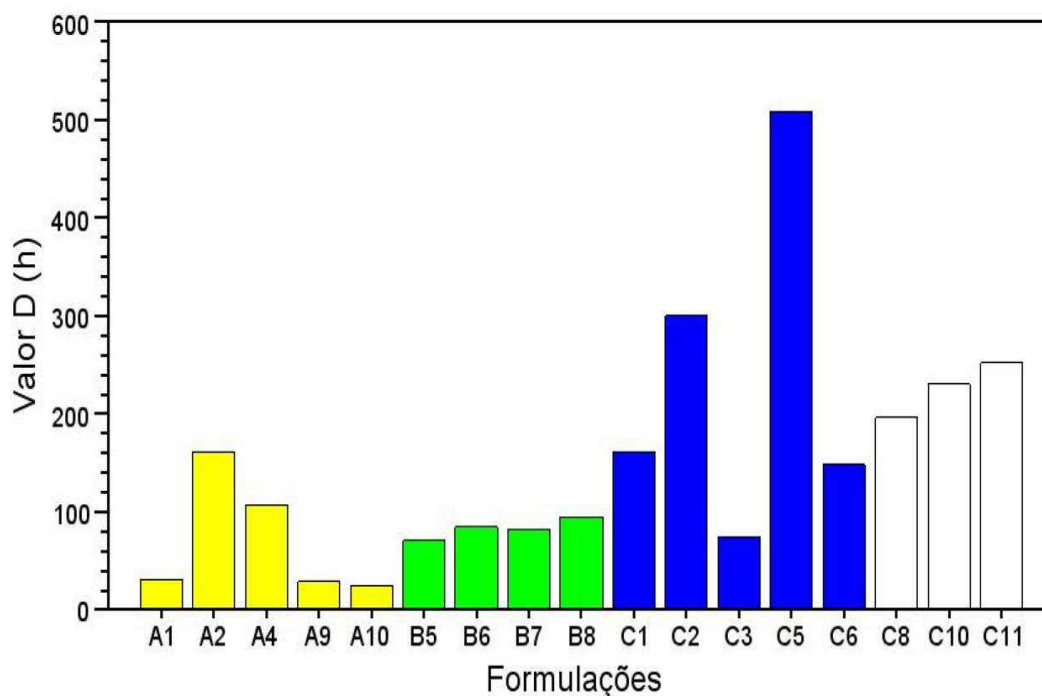


Fig. 4.19 - Comparação dos Valores D de todas as formulações

Para melhor detalhar a comparação foi feito a avaliação da estabilidade em leite fermentado e seco, armazenado sob refrigeração a 15°C. A comparação entre o leite fermentado, seco e refrigerado, alginato (A4) e cera (C5) é apresentado na Figura 4.20, observa-se que a formulação com cera, C5 foi a melhor que a formulação com alginato, A4 e o leite. Mostrando que as formulações com a adição dos outros constituintes melhoram o produto em relação ao leite fermentado e seco.

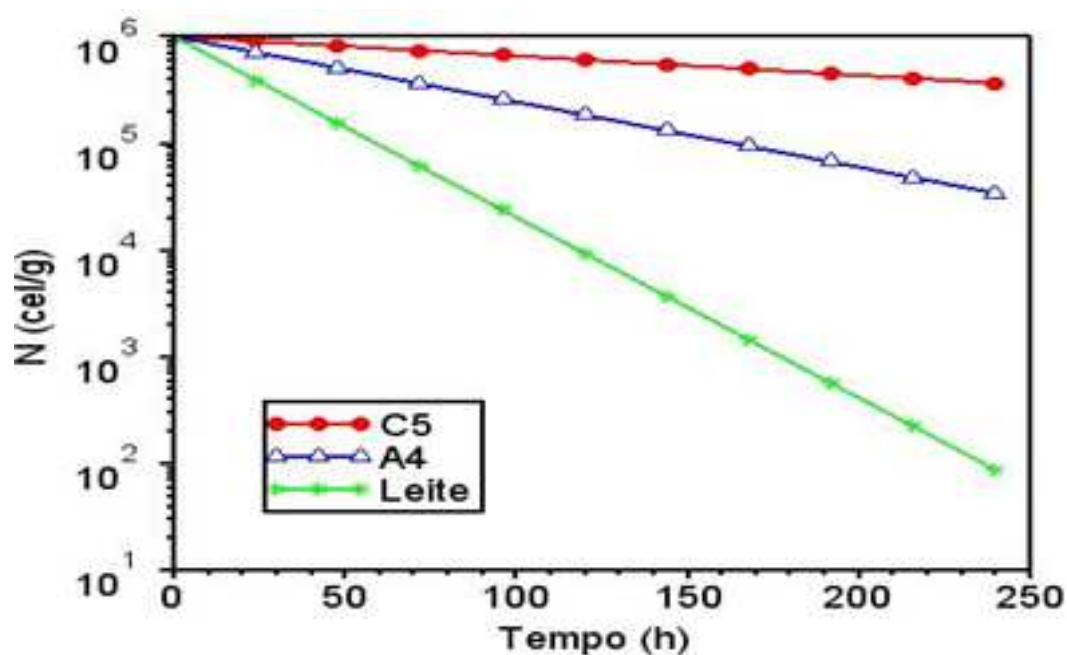
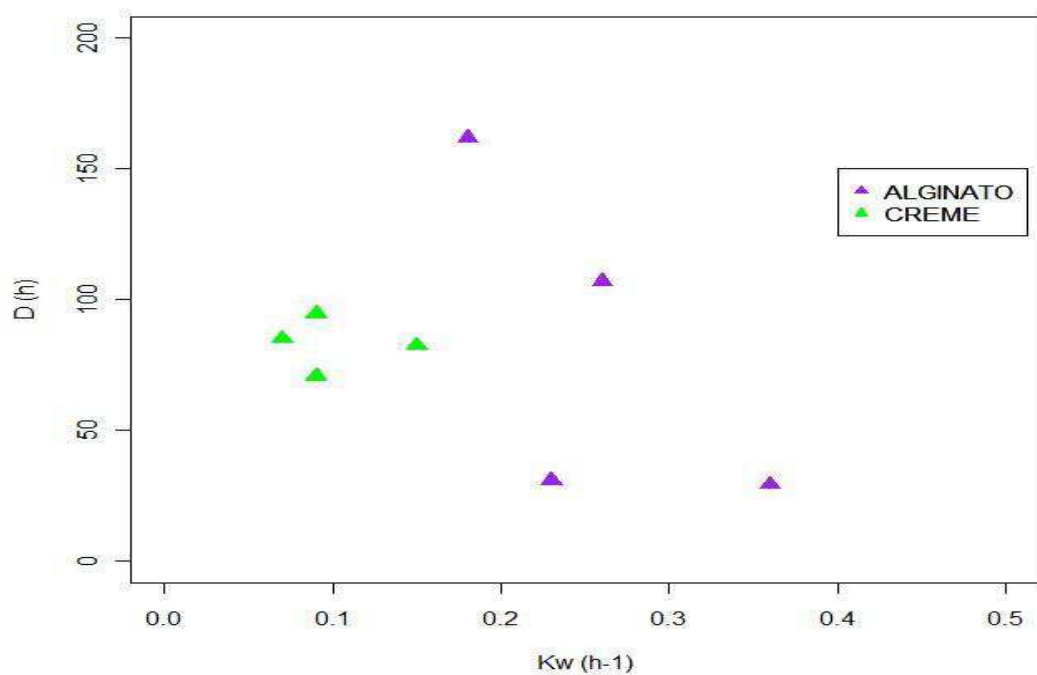
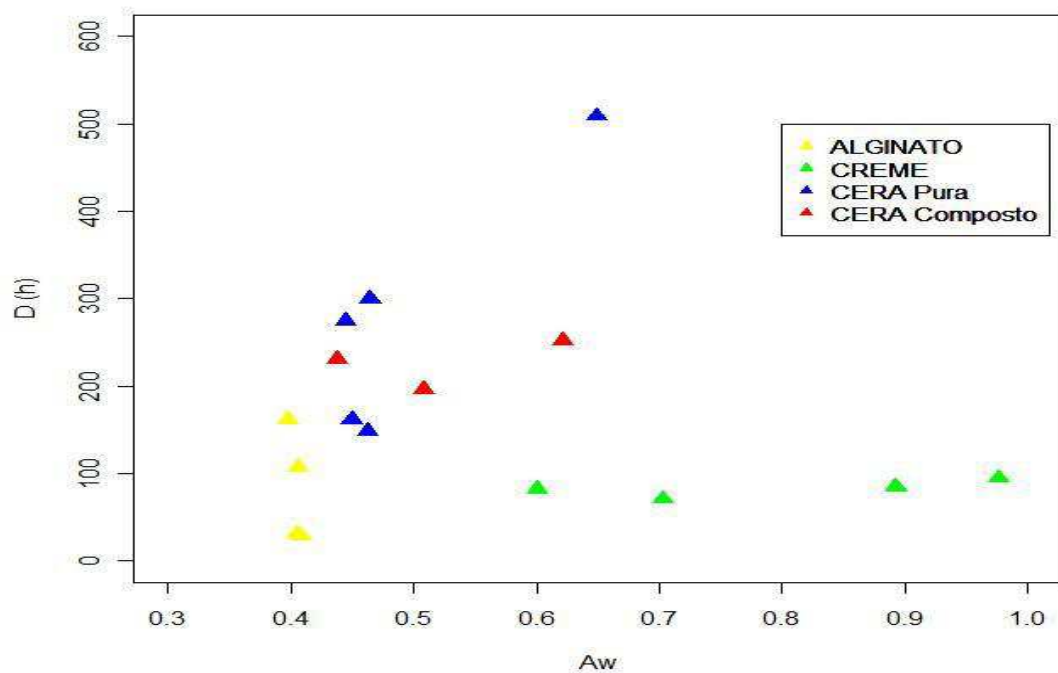


Fig. 4.20– Simulação da morte celular prevista pelos modelos ajustados para as melhores formulações de alginato, cera de abelha e leite

Os resultados da perda de água (Figura 4.21) e atividade de água (Figura 4.22) mostram que a velocidade com que se perde água (Figura 4.21) e a baixa atividade de água não explicam por completo o fenômeno da estabilidade, pois não há nenhuma relação direta entre estas variáveis e a estabilidade, assim a estabilidade resulta da combinação de diferentes fatores.

Fig 4.21 – Comparação entre K_w e Valor D nas formulações de alginato e cremeFig 4.22 – Comparação entre A_w e Valor D em todas as formulações

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a secagem em estufa, com circulação forçada a $43 \pm 1^\circ\text{C}$, em condições de saturação com cloreto de cálcio, é uma forma eficaz de gerar preparações com células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* LA 5, sendo que, embora diferentes preparações tenham a mesma viabilidade inicial, as mesmas são distintas na estabilidade.

As características do meio sólido e os aditivos influem na estabilidade do produto, de forma que a viabilidade inicial não se mostra um bom parâmetro na quantificação da estabilidade do produto. Ainda, referente ao uso da estufa, tem-se que a transferência de massa associada à perda de água é maior nas formulações com alginato que nas formulações com creme de leite.

Pode-se concluir que todas as formulações sólidas testadas foram satisfatórias no aumento da estabilidade do produto, ou seja, foram capazes de ampliar a sobrevivência que as células teriam se fossem células secas separadas do meio nutricional ou células secas com leite ao final da fermentação. Parte desta estabilidade pode ser explicada pela baixa atividade de água.

Nas formulações secas, tem-se que o ácido ascórbico não se mostrou um aditivo adequado para ampliar a estabilidade do produto e que a adição de amido de mandioca aumentou a estabilidade, sendo que nas formulações com creme o uso conjunto do amido com agentes espessantes gerou maior estabilidade que o uso de amido sem agente espessante.

Dentre todas as formulações testadas, as formulações que utilizam cera de abelha foram as que geraram maior estabilidade, sendo que a adição de sacarose e a secagem das células são fatores que aumentam a estabilidade das formulações com cera.

Referente à análise de sobrevivência, tem-se que o modelo de Weibull mostrou-se adequado para representar a estabilidade e, segundo este modelo, o creme, o alginato e a cera não são capazes de reduzir a morte celular prematura, ou seja, não há efeito protetivo associado ao creme, ao alginato e à cera, nem a nenhum dos aditivos que foram utilizados nas diferentes condições testadas neste trabalho.

CAPÍTULO 6

SUGESTÕES FUTURAS

1. Investigar o efeito da secagem das células para tempos distintos de 3 e 24 horas.
2. Efetuar o estudo da otimização da composição de cera e sacarose.
3. Ampliar o estudo noq eu se refere ao uso de outras variedades de cera.
4. Utilizar outros modelos de análise de sobrevivência no estudo de estabilidade.

CAPÍTULO 7

APÊNDICE

APÊNDICE A

```

1  # Language R-- R version 2.13.0 (2011-04-13)--programa versao 1- jun 20 2011
2  setwd("D:/Soraya/Resultado experimento mestrado/CALCULOS ESTATISTICOS
  R")
3  x<-read.table("NOME DO ARQUIVO.txt", header=T)
4  N<-x$Cel;t<-x$time;t<-t*24;Ref<-x$Ref
5  CONT<-length(N);N0<-1e6;UL<-N0;
6
7  for (i in 1:length(N))
8    { UL[i]<-Ref[i]-N[i];if (UL[i] <= 0) { UL[i]<-1} }
9
10 STATE<-rep(c(1),CONT);
11 library(survival)
12 s <- Surv(UL,STATE)
13 sr <- survreg(s~1,dist="weibull")
14 summary(sr)
15 print(paste("beta =",1/sr$scale))
16 print(paste("eta =",exp(sr$coefficients[1])))

```

Exemplo de resolução para CREME B8:

```

> setwd("D:/Soraya/Resultado experimento mestrado/CALCULOS ESTATISTICOS R")
> x<-read.table("WEIBULL_CREME_B8.txt", header=T)
> N<-x$Cel;t<-x$time;t<-t*24;Ref<-x$Ref
> CONT<-length(N);N0<-1e6;UL<-N0;
>
> for (i in 1:length(N))
+ { UL[i]<-Ref[i]-N[i];if (UL[i] <= 0) { UL[i]<-1} }
>
> STATE<-rep(c(1),CONT);
> library(survival)
Loading required package: splines
> s <- Surv(UL,STATE)
> sr <- survreg(s~1,dist="weibull")
> summary(sr)

```

Call:

```
survreg(formula = s ~ 1, dist = "weibull")
```

	Value	Std. Error	z	p
(Intercept)	10.8	0.709	15.28	1.03e-52
Log(scale)	1.2	0.174	6.91	4.79e-12

Scale= 3.32

Weibull distribution

Loglik(model)= -277.1 Loglik(intercept only)= -277.1

Number of Newton-Raphson Iterations: 7

n= 24

```
> print(paste("beta =",1/sr$scale))
```

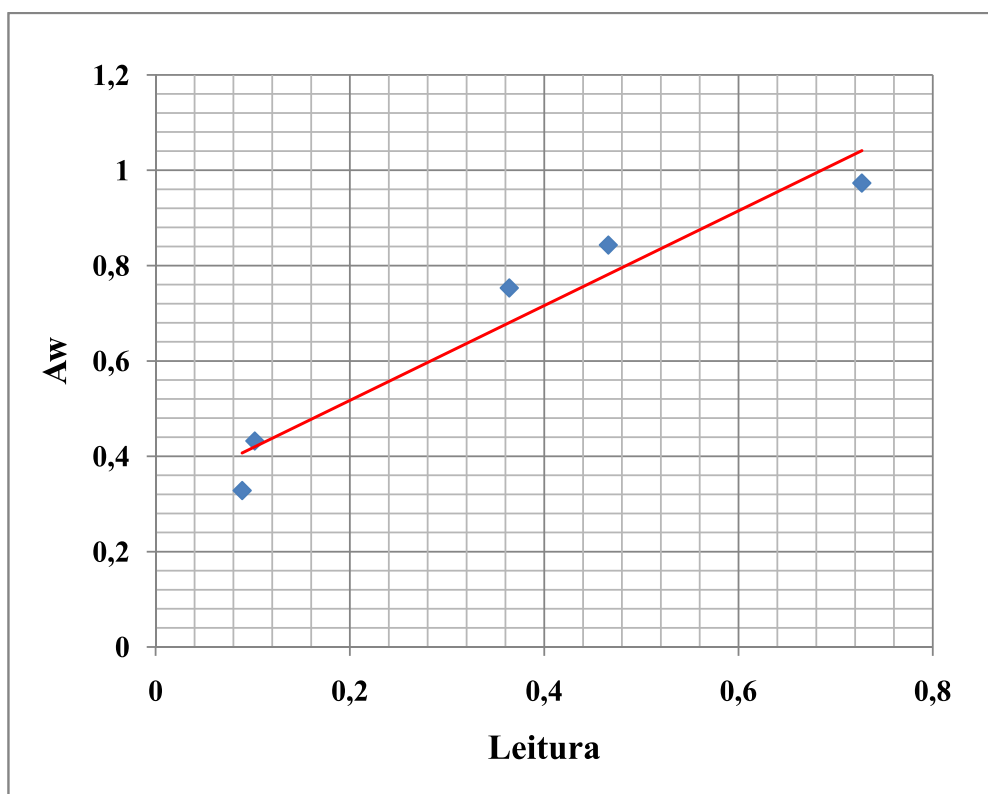
```
[1] "beta = 0.300775259670855"
```

```
> print(paste("eta  =",exp(sr$coefficients[1])))
```

```
[1] "eta  = 50933.7858217546"
```

APÊNDICE B

Sais	Leitura	Aw
K ₂ SO ₂	0.727	0.973
NaCl	0.364	0.753
K ₂ CO ₃	0.102	0.432
MgCl ₂	0.089	0.328
KCl	0.466	0.843



$$\text{Atividade} = 0,99416 \times \text{leitura} + 0,31824$$

$$(R^2 = 0,9115 \text{ } p = 0,007413)$$

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, A.; LYGEROS, J.; SASTRY, S. S. Probabilistic safety and optimal control for survival analysis of *Bacillus subtilis*. Control Letters, v. 59, p. 79 – 85, 2010.

ABBOTT, B. J. Immobilized cells. Annual reports on fermentation. PERLMAN. Ed. Ac. Press. New York, vol. 1 205- 233, 1997.

ABBOTT, B. J. Immobilized cells. Annual reports on fermentation. PERLMAN. Ed. Ac. Press. New York, vol. 2 91 - 123, 1997.

ABIEPCS - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA. Disponível em: www.abiepcs.org.br. Acesso em Janeiro / 2011.

ABCS – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE SUÍNOS. Disponível em: www.abcs.org.br/portal/index2.jsp. Acesso em Janeiro/ 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecnologia/listaalega.htm>. Acesso em: Março/ 2011.

AKPINAR, E. K.; MIDILLI, A.; BICER, Y. The first and second law analyses of thermodynamic of pumpkin drying process. Journal of Food Engineering, v. 72, p. 320 – 331, 2006.

ALPAS, H.; HILGEN, M.; BOZOGLU, T. F.; KATNAS, S. Mathematical modeling of survival and weight loss of Baker's yeast during drying. Enzyme and Microbial Technology, v. 19, p. 346-351, 1996.

ALVES, F. S. F.; PINHEIROS, R. R., A importância do leite de cabra na nutrição humana. Registro da Agropecuária Catarinense, 2003. Revista Brasileira Agropecuária, ano 2, n. 15, p. 54 – 62, 2003.

ARAÚJO, J. M. A., Química de alimentos – Teoria e prática, 3ª edição, 2006, p. 478.

AXELSSON, L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S., WRIGHT, A., (EDS.). Lactic acid bacteria. New York: Marcel Dekker, 1993. cap.1, p.1-63.

BATISTA, M. A., CARVALHO, W., SILVA, S. S. Imobilização de células de *Candida guilliermondii* em gel de alginato de cálcio: Efeito do tempo de cura na viabilidade celular. In: Simpósio de Iniciação Científica, 3, 1999, Marília Brasil. Anais de Congresso. Marília: UNIMAR- Universidade de Marília, p. 150, 1999.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical engineering fundamentals 2ª ed. Singapore: Mc Graw- Hill International Edition, 98 p., 1986.

BLACK, G. M. Immobilized biomass systems. In: E. B. C. Symposium on biotechnology. Nutfield, Great Britain, 218- 229 1983.

BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M. N. de. Fundamentos de Tecnologia de Alimentos. v.3. Ed. Atheneu. São Paulo, 1998.

BEG, Q. K.; BHUSHAN, B.; KAPOOR, M.; HOONDAL. G. S Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp. QG- 11-3 and application in biobleaching of eucalyptus Kraft pulp. *Enzyme and Microbial Technology, Surrey*, v. 27, n. 7, p. 459-466, Oct. 2000.

BEIJERINK, M.W. Sur les ferments de lactique de l'industrie (Lactic acid bacteria of the industry.) Arc Néerland des Sciences Extractes et Naturelles. v. 6, p. 212-43, 1901 (in French).

BILIADERIS, C. G., ARVANITOYANNIS, I., IZYDORCZYK, M. S., & PROKOPOWICH, D. J. Effect of hydrocolloids on gelatinization and structure formation in concentrate waxy maize and wheat starch gels. *Starch/Starke*, 49, 278–283, 1997.

BIOLOGIA COMPOSIÇÃO CELULAR LIPÍDEOS. Disponível em: <<http://biologiapronta.blogspot.com/composicao-quimica-celular-lipideos.html>> Acesso em: Maio/2011.

BIROL, G.; DORUKER, P.; KIDAR, B.; ONSAR, Z. L.; ULGEN, K. Mathematical Description of Ethanol Fermentation by Immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, v. 33, n. 7, p. 763 - 771, 1998.

BOBBIO, F.O. E BOBBIO P.A. Carboidratos. In: Introdução à química de alimentos. 2ª edição. São Paulo: Livraria Varela, 1992. p 11-64.

BRASIL. Ministério da AGRICULTURA. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal Divisão de Normas Técnicas. Decreto nº 30691, de 29 de março de 1952. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=14974>> . Acesso em: 11 junho, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Creme de Leite. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. *Diário Oficial da União*, 11/03/1996, Seção 1, p. 3977-3978.

BRASIL. Resolução no 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Diário Oficial, Brasília, 24 de julho de 1978. (Seção 1, parte 1).

BUCKER, C. Cells immobilization in calcium alginate. In: Immobilization techniques for cells/ organelles. *Methods in Enzymology*, San Francisco, v. 135, p. 175-189, 1987.

BURTON, B. T., Human Nutrition. A textbook of nutrition in health and disease. 3ª edição. New York: H.J. Hernz, 1976. 530 p.

CARAMORI JÚNIOR, J.G. Efeito de probióticos e prebióticos na ração de frangos de corte sobre o desempenho, rendimento de carcaça, características químicas e presença de *Salmonella spp* na carne. 56p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Estadual Paulista Júlio e Mesquita Filho (UNESP – Botucatu), São Paulo, 2001.

CARBONARA, E.; PASOTTI, P.; Social dynamics and minority protection. International Review of Law and Economics, v. 30, p. 317–328, 2010.

CARVALHO, C. Estudo da imobilização de *Candida guilliermondii* FTI 20037 para obtenção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar. Lorena, 2000. 108 p. dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial)- Departamento de Biotecnologia Industrial, Faculdade de Engenharia Química de Lorena.

CASTRO, P. S.; COBUCCI, R. M. A.; GALERA, J. S. Determinação de vida útil de alimentos. In: SEMANA DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS, 11. Goiânia, 2008.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations International Journal of Food Microbiology. v. 35, n. 1, p. 1-27, 1997.

CHAPLIN, M. Hydrocolloids. London South Bank University, 2006 Disponível na Home Page: <http://www.lsbu.ac.uk/water/hydro.html>. Acesso em 20 fev. 2011.

CHIQUEIRI, J. Probiótico e Prebiótico na Alimentação de Suínos em Crescimento e Terminação. 2003. 59 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal). Área de concentração: Produção Animal. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes – RJ, 2003.

COOPER, P. F. e WHEELDON, D. H. V. Biological fluidised bed treatment of water and wastewater. COOPER, P. F. and ATKINSON, B. Ed. Ellis Horwood, Cap. 7, 19981.

- CORNATZER, W. E., Role of nutrition in health and disease, Springfield: C. C. Thomas, 1989. 423 p.
- CÔRTEZ, J. A. Epidemiologia: conceitos e princípios fundamentais, Livraria Varela, São Paulo, 1993.
- COSTA, L. B. Extratos vegetais como alternativas aos antimicrobianos promotores do crescimento de leitões recém-desmamados, 51 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - USP, Piracicaba. 2005.
- COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. Apicultura: Manejo e Produtos, 1. ed. Jaboticabal – SP – FUNEP: [s.n.], 1996.
- CRIAR E PLANTAR. Equipe de Apicultura/FZEA-USP. Cera. Disponível em: <http://www.criareplantar.com.br/pecuaria/lerTexto.php?categoria=9&id=252>. Acesso em: Julho / 2011
- CROSS, M. L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens, *FEMS: Immunology and Medical Microbiology*, Amsterdam, v.34, n.4, p.245-253, 2002.
- CUI, Z. W.; XU, S. Y.; SUN, D. W. Microwave–vacuum drying kinetics of carrot slices, *Journal of Food Engineering*, v. 65, p. 157 -164, 2004.
- DALGARD, P. Introductory Statistics with R, Springer-Verlag , Nova Iorque, 266p ,2002.
- DAVID, M. D., CHEUNG, Y. B., PARMAR, M. K.B, Survival Analysis: A Practical Approach John Wiley & Sons 266 p. 2006.
- DELLAGLIO, H., ROISSART, H., TORRIANI, S., CURK, M.C., JANSSENS, D. Caractéristiques générales des bactéries lactiques, In: ROISSART, H., LUQUET, F.M., eds. *Bactéries lactiques. aspects fondamentaux et technologiques*. Paris: Loriga, 1994. v.1, p.25-139.

DE MAN, J.C., ROGOSA, M, SARPE, M.E. A medium for the cultivation of *lactobacilli*. Journal of Applied Bacteriology, Oxford, v. 23, p. 130-135, 1960.

DE VRESE, M.; STEGELMANN, A.; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*, New York, v.73, n.2, p.421S-429S, 2001.

DUARTE, R. B. de A. Histórias de sucesso: agronegócios: apicultura. 1. ed. Brasília: SEBRAE, 2006.

EARLY, R. Tecnologia de los Productos Lácteos. Zaragoza, Acribia, p. 459, 2000.

EVANGELISTA, J. Tecnologia de alimentos. Rio de Janeiro: Atheneu, 1987.

EXPEDIÇÃO ECOSSISTEMAS COSTEIROS DO BRASIL. Disponível em: <<http://flog.clickgratis.com.br/biomas/foto/algas-marrons/379876.htm>> Acesso em: Junho, 2011.

FAN, L. S. Gas-liquid-solid fluidization engineering. Boston: Butterworths Publishers, 1989.

FEDALTO, L. M.; TKACZ, M.; ADER, L.P. Probióticos na alimentação de leitões do desmame aos 63 dias de idade. *Archives of Veterinary Science*, Curitiba, v.7, n.1, p.83-88, 2002.

FERREIRA, Célia L.L., TESHIMA, Elisa. Prebióticos, estratégia dietética para a manutenção da microbiota colônica desejável. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. ano III –n. 16 – set./out. p. 22-25, 2000.

FOOKS, L. J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy journal*. v.9, p.53-61, 1999.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 2005.

FRANCO, C.M. L., DAIUTO, E.R., DEMIATE, I.M., CARVALHO, L.J.C., LEONEL, M., CEREDA, M.P., VILPOUX, O.F. e SARMENTO, S.B.S. Propriedades gerais do amido/ [Coordenadora: Marney Pascoli Cereda] – Campinas: Fundação Cargill, 2001, v. 1, p.: i1 – Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas.

FU, N.; CHEN, X. D. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. Food Research International. V. 44, p. 1127 – 1149, 2011.

FULLER, R. The importance of lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. Br. Poult. Sci., Abingdonv. 18, p. 85-94, 1977.

FULLER, R. History and development of probiotics. In: FULLER, R. (ed) Probiotics. New York: Chapman & Hall, 1994, p. 1-8.

FULLER, R. (1989). Probiotics in man and animals. Journal of applied Bacteriology. v. 66, p. 365-378, 1989. Apud: International dairy journal. v. 11, p. 1-17, 2001.

GALLANT, D.J., BEWA, H., BUY, Q.H., BOUCHET, B., SZYLIT, O. AND SEALY, L. On ultrastructural and nutritional aspects of some tropical tuber. Starch/Stärke, v. 34, n. 8, p. 255-262, 1982.

GERBESH, N.; BUCHHOLZ, R. New processes and actual trends in biotechnology. Fews Microbiology Reviews, Amsterdam, v. 16, n. 2-3, p. 259-269, Feb. 1995.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends in Food Science and Technology. v. 10, n. 4/5, p. 139-157, 1999.

GRANT, G. T.; MORRIS, E. R.; REES, D. A., SMITH, P. J. C.; THOM, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the eg-box model. FEBS LETTERS, Amsterdam, v. 32, p. 195-198, May. 1973.

GUEIMONDE, M, JALONEN, L., HE, F, HIRAMATSU, M, SALMINEN, S (2006). Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. Food Research International 39 467–471.

HAIDER, T.; Husain, Q. Concanavalin A layered calcium alginate–starch beads immobilized-galactosidase as a therapeutic agent for lactose intolerant patients . International Journal of Pharmaceutics, v.359, p. 1- 6, 2008.

HEBBEL, Prof. Dr. Hermann Schmidt. Aditivos y Contaminantes de Alimentos. Editora Fundacion Chile. Santiago-Chile. 1979.

HILL, R.; OKOROAFOR, E. U.; Weibull statistics of fibre bundle failure using mechanical and acoustic emission testing: the influence of interfibre friction. Composites v. 26, p. 699-705, 1995.

IGARASHI, M.; LIYAMA, Y.; KATO, R.; TOMITA, M.; ASAMI, N.; EZAWA, I. Effect of *Bifidobacterium longum* and lactulose on the strenght of bone in ovariectomized osteoporosis model rats. Bifidus, v.7, p. 139-147, 1994.

INOOKA, S.; UEHARA, S.; KIMURA, M. The effect of *Bacillus natto* on the T and B lymphocytes from spleens of feeding chickens. Poult. Sci., Champaign, v. 65, p. 1217- 1219, 1986.

ITSARANUWAT, P.; HAL-HADDAD, K. S.; ROBINSON, R. K. The potential therapeutic benefits of consuming health promoting fermented dairy products: a brief update. International Journal of Dairy Technology, Huntingdon, v. 56, n. 4, p. 203-210, 2003.

JACK, T. R. E ZAJIC, J. E. The immobilization of whole cells. Adv. Biochem. Eng. , S, 125-145, 1977.

JIN, L. Z.; MARQUARDT, R. R.; BAIDOO, S. K. Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99 and 987P by the *Lactobacillus* isolates from porcine intestine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v.80, n.5, p.619-624, 2000.

KÄISTNER, U., HOFFMANN, H., DÖNGES R. AND HILBIG, J. Structure and solution properties of sodium carboxymethyl cellulose. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp.* **123-124** (1997) 307-328).

KAMERLING, J.P.; VLIEGENHART, J.F.G.; Structural studies on methylated starch granules. Starch/Stärke, v. 52, n. 2-3, p. 40-43, 2000.

KANDLER, O. and WEISS, N., 1986. Genus Lactobacillus Beijerinck 1901, 212AL, p. 1209-1234. In: SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E. and HOLT, J.G. (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.2. Baltimore: Williams & Wilkins.

KAMIMURA, R. Efeito de prebiótico e promotor de crescimento convencional na dieta de leitões desmamados sobre: desempenho, histomorfometria intestinal, níveis de IGA sérica total e análise econômica. 2006. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2006.

KAREL, S. F.; LIBICKI, S. B.; ROBERTSON, C. R. The immobilization of whole cells: Engineering principles. Chemical Engineering Science. V. 40, p. 1321-1354, 1985.

KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. Química Nova, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 134-143, 2008.

KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. Immobilized living cells and their applications. In: WINGARD, L. B., JR.; KATCHALSKI- KATZIR, E.; GOLDSTEIN, L. (Eds.). Applied biochemistry and bioengineering. New York: Academic press, 1983. V. 4, p. 189-245, 1983.

KJAERBYE, H. Quality aspects of UHT cream. Bulletin of International Dairy Federation, n. 315, p. 25 – 34, 1996.

KIM, H.S.; GILLILAND, S. Lactobacillus acidophilus as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. J. Dairy Sci., v. 66, p. 959-966, 1983.

KOLOT, F. B. Microbial Carriers: Strategy for Selection. Process Biochemistry. Agosto/Setembro, 1981.

KOZASA, M. Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding. *Microbiology Aliments Nutrition*, Paris, n.4, p.121-135, 1986.

KOZASA, M. Probiotics for animal use in Japan. *Vet. Sci. Tech. off Int. Epiz.*, v. 8, v. 2, p.517-531, 1989.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v. 44, n. 3, p. 329-347, 2008.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU. A.; BANAT. I. M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A.; Imobilization Technologies and Support Material Suitable em Alcohol Beverages Production: a Review. *Food Microbiology*. v. 21, p. 377-397, 2004.

KERN, M (2002). Food, Feed, Fibre, Fuel and Industrial Products of the Future: Challenges and Opportunities. *Understanding the Strategic Potential of Plant Genetic Engineering J. Agronomy & Crop Science*, v.188, p.291-305.

LABUZA, T. P., Propertios of water as related to the science quality of foods. *Proc. International Congress Food Science Technology*. Chicago, Institute Food Technology, 1970, p. 618 – 635.

LABUZA, T. P., The properties of water in relationship to water binding in foods: a review. *Journal Food Processing and Preservation*. U.S.A., p. 167 – 190, 1977.

LAMBERT, A.D., SMITH, J.P., DODDS, K.L. Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat – a review. *Food Microbiology*. n. 8, p. 267 – 297, 1991.

LARA, S.R. Tecnologia geral de aplicação de carragena. In: SIMPÓSIO SOBRE HIDROCOLÓIDES. Campinas, 1993. Anais, Campinas, ITAL, p.22-50, 1993.

LIMA, G.J.M.M. Uso de aditivos na produção de suínos. In: Simpósio sobre as implicações sócio-econômicas do uso de aditivos na produção animal, Piracicaba, Anais... Piracicaba: CBNA, p.51-68, 1999.

LEE, Y.K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. Handbook of probiotics. New York: Wiley, 1999. 211p.

LEE, E.T., WANG, J.W., Statistical methods for survival data analysis Wiley Interscience, 513 p. 2006.

LEE, Y. K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S. L. Handbook of probiotics. New York: Wiley, 1999, 211p.

LEO, W. J., MCLOUGHLIN, A. J.; MALONE, D. M., Effects of Sterilization Treatments on Some Properties of Alginate Solutions and Gels, Biotechnol. Prog., v. 6, p. 51-53, 1990.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. International Dairy Journal. v. 11, p. 1-17, 2001.

LONCIN, M. & MEARSON, R. L., Equilibrium between phases. In: Food engineering – principle and selected applications. U.S.A. Academic Press. Inc., p. 175 - 202, 1979.

MACDIARMID G. A. Handbook of Polyelectrolytes and Their Applications, Edited by Hari Singh Nalwa, Japan, vol. 2, 2002.

MAGALHÃES, E.O. Manual e apicultura. Módulo I, CD p/ADRS, Bahia, Brasil, 2001.

MAIANI, G., AZZINI, E., FERRO-LUZZI, A., Vitaminca C Instituto J. Vitam. Nutri. Res., v. 62, n. 4, p 289 – 295, 1993.

MANO, B.E.; MENDES, C.L. **Introdução a Polímeros**. Segunda Edição, p. 30, 1998.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Regulamento técnico de identidade e qualidade do creme de leite. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=4349>>. Acesso em 06 de julho de 2011.

MARTIN, J. H. Technical consideration for incorporating bifidobacteria and bifidogenic factors into dairy products. International Dairy Federation Bulletin. n. 313, p.49- 51, 1996.

MARTISEN, A.; SKJAK-BRAEK, G.; SMIDSRØD, O. Alginate as Immobilization Material: correlation Between Chemical and a Physical Properties of Alginate Gel Beads. Biotechnology and Bioengineering, v. 33, p. 79-89, 1989.

MARTEAU, P.; FLOURIÉ, B.; POCHART, P.; CHASTANG, C.; DESJEUX, J.F.; RAMBAUD, J.C. Role of the microbial lactase (EC 3.2.123) activity from yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase deficient humans. J. Nutrition. v.64, p.71, 1990a.

MASANJA, H.; SAVIGNY, de D.; SMITHSON, P .; SCHELLENBERG J.; JOHN, T.; MBUYA, C.; Upunda G.; Boerma, T.; VICTORA, C.; Smith,T.; MSHINDA, H. Child survival gains in Tanzania: analysis of data from demographic and health surveys. Lancet, v. 371, p. 1276–83, 2008.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de produtos apícolas. Instrução normativa nº 3. Legislação, Sistema de consulta a legislação – SISLEG. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>.

MONDRAGÓN-BERNAL, O. L. Desenvolvimento de alimento simbiótico fermentado de soja. Campinas, 2009. Tese (Doutora em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

MOURA, S.C.S.R., VITALI, A.A., FRANÇA, V.C.L., Propriedades Termofísicas de Soluções – Modelos Similares a Creme de Leite. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.21, p.209-215, 2001.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v.38, n.1, p.13-126, 1999.

OGAWA, M.; SHIMIZU, K.; NOMOTO, K.; TANAKA, R.; HAMABATA, T.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, T.; TAKEDA, Y. Inhibition of *in vitro* growth of Shiga toxinproducing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.68, n.1-2, p.135-140, 2001.

OLIVEIRA, F. F. Contribuição da análise térmica no desenvolvimento de formulações de batons. Dissertação de Mestrado. IQ/USP – 2002.

OLIVEIRA, M.A.; NISHIMOTO, E.K. Avaliação do desenvolvimento de plantas de yacon (*Polymnia sonchifolia*) e caracterização dos carboidratos de reserva em HPLC. *raz. J. Food Technol.*, v.7, n.2. p. 215-220, 2004.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A., SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.38, n.1, 2002.

ORIVE, G.; PONCE, S.; HERNÁNDEZ, R. M.; GASCÓN, A. R.; IGARTUA, M.; PEDRAZ, J. L. Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials*, v. 23, p. 3825-3831, 2002.

OZAWA, K.; YABU-UCHI, K.; YAMANAK, K. Antagonistic effects of *Bacillus natto* and *Streptococcus faecalis* on growth of *Candida albicans*. *Microbiol. Immunol.*, Tokyo, v. 23, n. 12, p. 1147-1156, 1978.

PARDI, C. M. *et al.* Ciências, higiene e tecnologia da carne. Goiânia: UFG, v. 1, 2001.

PARKER, R.B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal nutrition and health*. v. 29, p. 4-8, 1974. Apud *International Dairy Journal*. v. 9, p. 32-61, 1999.

PENNA, A. L. B. Hidrocolóides - Usos em Alimentos, Caderno de Tecnologia & Bebidas, UNESP, São José do Rio Preto, 2004.

PERDIGÓN, G.; HOLGADO, A. P. R. Mechanisms involved in the immunostimulation by lactic acid bacteria. In: FULLER, R.; PERDIGÓN, G. *Probiotics 3: immunodulation by the gut microflora and probiotics*. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000.

PEREDA, J. A. O.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVARES, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S., Tecnologica de Alimentos 2. Porto Alegre: Artmed, p. 105- 107, 2005.

PEREIRA, R. A. Monitoramento das atividades individuais de abelhas africanizadas relacionadas ao comportamento higiênico. São Paulo: Tese USP, 2008.

PINHO, R. F. Apicultura Coleção Agroindústria v. 10 – Cuiabá: SEBRAE/MT, 1997.

PHILLIPS, G. O. AND WILLIAMS, P. A. Handbook of hydrocolloids, CRC Press, Cambridge, England, 2000.

PHILLIPS, C. R. e POON, Y.C. Immobilization of cells. Editora Springer-Verlag, Berlin, 1998.

PILKINGTON, P. H.; MARGARITIS, A.; MENSOUR, N. A.; RUSSELL, I. Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentaton: a review. Jornal of the Institute of Brewing, London, v. 104, n. 1, p. 19-31, 1998.

PORTAL SÃO FRANCISCO. Disponível em: < [http://www .portalsaofrancisco. com.br /alfa /abelhas/abelha-5.php](http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/abelhas/abelha-5.php)>. Acesso em: Maio/ 2011.

PRADELLA, J. G. C. Reatores com células imobilizadas. In: LIMA, U. A. et al. *Biorecnologia Industrial: engenharia bioquímica*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. V. 2, p. 355-372.

RAYMENT, P.; WRIGHT, P.; HOAD, C.; CIAMPI, E.; HAYDOCK, D.; GOWLAND, P.; BUTLER, M.F. Investigation of alginate beads for gastro-intestinal functionality. Part 2: In vivo characterization Food Hydrocolloids, Volume 23, Issue 3, May 2009, Pages 833-839

RASIC, J.L.; KURMANN, J.A. Yoghurt: scientific grounds, technology, manufacture and preparations. Published by the authors. 428 g, 1978.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. Química de alimentos. São Paulo: Instituto Mauá de Tecnologia, 2004

REIG, A. L C, ANESTO, J. B. (2002). Prebióticos y probióticos, una relación Beneficiosa. Revista Cubana Aliment Nutr , vol 16, p. 63-68.

ROOS, N M, KATAN, M B (2000). Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. Am J Clin Nutr ,v.71, p.405-411.

ROSS-MURPHY, S. B., SHATWELL, K. P., & SUTHERLAND, I. W. Influence of acyl substituents on the interaction of xanthans with plant polysaccharides. Food Hydrocolloids, 10, 117–122, 1996.

SANDERSON, G.P. Polysaccharides in Foods. Food Technol., v. 7, n. 83, p.50-57, 1981.

SANTIAGO, O. Controle microbiológico de qualidade. Revista Instituto Cândido Toste, v. 27, n. 165, 1972.

SARRÁ, M.; GÒDIA, F. Continuous production of a hybrid antibiotics by streptomyces lividans tk 21 pellets Iná a three-phase fluidized-bed bioreactor. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 53, n. 6, p. 601-610, Mar. 1996.

Sá, J. P. M. Applied Statistics using SPSS, Statistica, Matlab and R. Nova Iorque: Springer-Verlag, 505 p. 2007.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. Rev. Bras. Cienc. Farm. vol.42, nº1. São Paulo. Jan./Mar. 2006.

SAARELA, M; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology. v. 84, p. 197-215, 2000.

SALMINEN, S., OUWEHAND, A., BENNO, Y., LEE, Y. K. Probiotics: how should they be define? Trend in Food Science & Technology. v.10 (3), p. 107-110, 1999

SANCHES, A. L. Probiótico, Prebiótico e Simbiótico em rações de leitões ao desmame. 2004. 63p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

SANDERS, M. E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria Inst. Dairy J. Amsterdam, v. 8, p. 341-347, 1998.

SANTOS, A. B., Produção de probióticos para uso veterinário com células imobilizadas de lactobacillus. Universidade Federal de Uberlândia, 2007.

SENAI (Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial). Elementos de apoio para o sistema APPCC. Rio de Janeiro, 2000.

SILVA, J.A. Tópicos da tecnologia de alimentos. São Paulo: Varela, 2000.

SILVA, A.M.L. Apostila de aulas práticas de análise físico-química de alimentos. Goiânia: PUC Goiás, 2008.

SCOOT, C. D. Immobilized cells: a review of recent literature. Enzyme microbial Technology, Surrey, v. 9, n. 2, p. 66-72, Feb. 1987.

SCUTTI, L.F.; ROSSI, E.A. Propriedades profiláticas e terapêuticas das culturas lácticas. Cadernos da Nutrição, v. 12, p. 9-18, 1996.

SEIBEL, W. Funktionelle lebensmittel auf getreidebasis. Getreide Mehl und Bot., v. 52, p. 185-187, 1998. In: BEHRENS, J.H.; ROIG, S.M.; DA SILVA, M.A.P. Aspectos de funcionalidade, de rotulagem e de aceitação de extrato hidrossolúvel de soja fermentado e culturas lácteas probióticas. Bol. SBCTA, v. 34, p. 99-106, 2000.

SERP, D; CANTANA, E.; HEINZEN, C.; VON-STOCAR, U.; MARSON, I. Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization. Biotechnology and Bioengineering. New York v. 70, p. 41-53, 2000.

SRIDEVI, V.; SRIDHAR, P. Production of cephamycin C in repeated batch operations from immobilized streptomyces davuligerus. Process Biochemistry, Oxford, v. 36, n. 3, p. 225-231, Oct. 2000.

STRUMILLO, C.; KUDRA, T. Drying: Principles, Applications and Design. In: Hughes, R. Topics in Chemical Engineering. 3, University of Salford, UK, 1986.

SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N.; ARUMUGASWAMY, R.; Peiris, P.; KAILASAPATHY, K., Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. International Journal of Food Microbiology, v. 62, p. 47-55, 2000.

SUTHERLAND, I. W. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, 12, 393-447, 1994.

SWINKELS, J. J. M. Composition and properties of commercial native starch. Starch/Stärke, v. 37, n. 1, p. 1 - 5, 1985.

TRAUB, H. Drying – The Cinderella of the process industry. In: DRYING 2004 – Proceedings of the 14th International Drying Symposium (IDS 2004), São Paulo, Brazil, 22-25 August 2004, vol. B, pp. 798-804.

TULLOCH, A. P. Beeswax- composition and analysis. Prairie Regional Laboratory, National Research Council of Canada, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, 1980.

TÜRKET, M.; KANARYA, A.; YUZGEC, U.; KAPUCU, H.; SENALP, Z. Drying of baker's yeast in batch fluidized bed. Chemical Engineering and Processing, V.45, P. 1019 -11028, 2006.

VAN DE BURG, Y.E.M.; BERGSMA, J.; BLUCKER, I.P.; MIJLAND, P.J.H.C.; VEIGA, P.; VILPOUX, O. E CEREDA, M.P. Possíveis usos da fécula de mandioca. Critérios de qualidade. Botucatu: Cerat/Unesp, 1994, 25 p.

VANSELL, G. H., BISSON, C. S. Plant Quarentine, U. S. Dept. Agr., Bur. Entomol. 1940. E – 485.

VEELKEN, M; PAPE, H. Production of tylosin and nikkomyein by immobilized streptomyces cells, European Jounal of Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 15, n. 4, p. 206-210, Dec. 1982.

YANG, S. F.; Rahim, M. A. Economic statistical process control for multivariate quality characteristics under Weibull shock model, Int. J. Production Economics, v. 98, p. 215–226, 2005.

WANG, Q.; HU, X.; DU, Y.; KENNEDY, J. F. Alginate/starch blend fibers and their properties for drug controlled release, Carbohydrate Polymers, v. 82, p. 842–847, 2010.

WATH, A. H. The chemistry and technology of waxes Reinhold Publishing Corporation, New York USA, 1947. 519p.

WATKINS, B.A.; MILLER, B.F. Competitive gut exclusion of avian pathogens by *Lactobacillus acidophillus* in gnotobiotic chicks, **Poultry Sci.**, v. 61, p. 1772-1779, 1983.

WENDHAUSEN JÚNIOR, R. Estudo sobre Utilização de Crisotila como suporte de Células de *Saccharomyces cerevisiae* para o uso em processo Contínuo de Fermentações, Blumenau, Fevereiro 80p. Tese (Doutorado em Química) instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1998.

WILLAERT, R. G.; BARON, G. V.; DE BACKER, L. Immobilised living cell systems: modeling and experimental methods, Chichester: John Wiley & Sons, 1996. 386 p.

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G. R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies, Inst. Dairy J., Amsterdam, v. 8, p. 473-479, 1998.

ZIEMER, C.J.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.8, p.473-479, 1998.

ZIER, W. C. Microbiologia de los alimentos. Zaragoza: Acribia, 1972.

ZOVARO, R. Ceras de abelhas: Produção e beneficiamento. AEP, Brasil, 2007.