



Marta Sofia Alves

Licenciada em Nutrição Humana e Qualidade Alimentar

**Microencapsulação de bactérias
lácticas com potencial probiótico para
produção de pasta de azeitona**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar/Qualidade Alimentar

Orientador: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro
Durão Leitão, Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Cátia Maria Morgado Peres, Instituto de
Tecnologia Química e Biológica

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte – FCT/UNL

Arguente: Doutora Maria de Fátima Gonçalves Ribeiro dos Santos Silva Lopes – ITQB/FCT

Vogal(ais): Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Leitão – FCT/UNL

Eng.^a Cátia Maria Morgado Peres – ITQB/UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro de 2013



Marta Sofia Alves

Licenciada em Nutrição Humana e Qualidade Alimentar

**Microencapsulação de bactérias
lácticas com potencial probiótico para
produção de pasta de azeitona**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar/Qualidade Alimentar

Orientador: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro
Durão Leitão, Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Cátia Maria Morgado Peres, Instituto de
Tecnologia Química e Biológica

Copyright

Copyright © - Todos os direitos reservados. Marta Sofia Alves. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

“Microencapsulação de bactérias lácticas com potencial probiótico para produção de pasta de azeitona”

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Começo por agradecer à Doutora Cidália Peres, pela proposta de realização deste trabalho no seu laboratório, no Instituto de Tecnologia Química e Biológica. Agradeço a sua orientação, estímulo, confiança, exemplo profissional e essencialmente a sua amizade.

À Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão, docente da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, agradeço a sua disponibilidade para orientação e toda a dedicação dada no decorrer deste trabalho.

À Cátia Peres, co-orientadora, agradeço todo o carinho, amizade e conhecimentos transmitidos.

Ao Doutor Adrián Hernández, deixo um obrigado especial, não só pela atenção dada, mas também pelas seis horas de diferença horária nunca terem impedido a sua disponibilidade para esclarecimento de dúvidas e sugestões que pudessem enriquecer este trabalho.

Ao Audry Peredo e Eliza Romero agradeço a amizade, as questões levantadas e todos os bons momentos passados dentro e fora do laboratório.

À Cármen Fernandes, Sónia Moita e Sónia Serrano, além de um pedido de perdão, reconheço e agradeço toda a ajuda que me foi dada na esterilização de material físico e soluções, na descontaminação e lavagem da quantidade exuberante de material feita diariamente.

À Clénira Varela e Liliana Moreira, agradeço o carinho, confiança e disponibilidade de ajuda para realização dos ensaios.

À minha mãe, o meu exemplo de vida, agradeço a confiança, carinho e apoio que sempre me deu.

Ao meu pai, apesar de já ausente, agradeço a companhia e proteção dada aquando do meu regresso tardio a casa e a coragem que nele procurei nos momentos menos bons.

A todos aqueles que de certa forma me acompanharam no decorrer do meu trabalho, do coração

Muito Obrigada!

Resumo

Neste estudo foram aplicadas metodologias para avaliação da aptidão probiótica de estirpes de bactérias lácticas isoladas de processos de fermentação de azeitona da cultivar Galega.

Das 156 estirpes de bactérias lácticas inicialmente isoladas 13 evidenciaram, em ensaios preliminares, tolerância aos ácidos e sais biliares do aparelho digestivo e mostraram ter um potencial probiótico. Nenhuma das estirpes mostrou capacidade hemolítica ou capacidade para degradar a mucina. Todas as estirpes apresentaram capacidades de auto-agregação (3,77-12,80%), co-agregação (8,38-45,70%) e aderência a células Caco-2 (0,83-15,3%). A atividade antimicrobiana e a resistência ao processo de digestão simulado foram também evidenciadas.

Dos 13 isolados estudados, foram selecionados dois *Lactobacillus plantarum* para incorporação numa pasta de azeitona previamente preparada. Tendo em conta que a viabilidade das bactérias probióticas num produto, no momento de consumo, é um aspeto importante a ter em conta aquando da avaliação da sua eficácia e porque deve sobreviver durante o processamento, a vida útil do alimento, bem como tolerar as condições extremas do estômago e do intestino optou-se por recorrer à técnica da microencapsulação para proteção das células.

Os resultados demonstraram que a microencapsulação é uma técnica eficaz para a sobrevivência das estirpes, é dependente da temperatura de armazenamento e da estirpe, tendo sido verificada uma maior viabilidade celular à temperatura de 4 °C. A microencapsulação parece proteger as células de temperaturas elevadas, no entanto essa proteção é dependente da estirpe. Na pasta de azeitona o processo de microencapsulação não melhorou a sobrevivência das bactérias durante o armazenamento. No entanto, a estirpe 33 apresentou uma viabilidade na ordem de 10^6 UFC/g após 30 dias de armazenamento, condição esta necessária para que possa ser considerada uma estirpe probiótica.

Palavras-chave: Bactérias lácticas, fermentação, probiótico, pasta de azeitona, microencapsulação.

Abstract

In this study, we have applied methodologies for evaluation of probiotic capacity of lactic acid bacteria strains, isolated from table olive fermentation process of cultivate Galega.

The 13 strains isolated out of 156, which initially showed acid and bile salts tolerance, proved to have a probiotic potential. None of the strains showed hemolytic capacity or ability to degrade mucin. All strains showed auto-aggregation (3.77-12.80%) co-aggregation (8.38 to 45.70%) and adhesion to Caco-2 cells (0.83- 15.3%). The antimicrobial activity and resistance to simulated gastrointestinal conditions process was also assessed.

Two *Lactobacillus plantarum* were selected from the 13 isolates studied for incorporation in olive paste prepared beforehand. The viability of probiotic bacteria in a product at the point of consumption is an important consideration for their efficiency, as they have to survive during the processing and shelf life of food and gastrointestinal supplements, such acidic conditions of the stomach, enzymes and bile salts in the small intestine, we used the microencapsulation technique for protecting cells.

The results have demonstrated that microencapsulation is an effective technique for strain survival. This technique has been shown to be dependent on storage temperature and strain, the greater cell viability was found at 4 °C. Microencapsulation may protect cells from high temperatures; however this protection is strains dependent. The microencapsulated strains when incorporated in olive paste did not improve the bacterial survival during storage. Strain 33 has viability around 10^6 cfu/g after 30 days of storage, essential condition to be considered a probiotic strain.

Keywords: Lactic acid bacteria, fermentation, probiotic, *Lactobacillus plantarum*, olive paste, microencapsulation

Índice Geral

Pág.

1. Enquadramento e objetivo.....	1
2. Introdução	3
2.1 Probióticos.....	3
2.1.1 Definição	3
2.1.2 <i>Lactobacillus e Bifidobacterium</i>	3
2.1.3 Efeitos benéficos na saúde.....	4
2.1.4 Mecanismos de ação das bactérias probióticas.....	5
2.1.5 Critérios de seleção.....	6
2.1.5.1 Critérios de segurança.....	6
2.1.5.2 Critérios de funcionalidade	6
2.1.5.3 Critérios tecnológicos	8
2.2 Prebióticos.....	8
2.3 Microencapsulação.....	9
2.3.1 Definição e objetivos	9
2.3.2 Materiais usados	9
2.3.3 Métodos de dispersão	11
2.3.4 Aplicação e vantagens da microencapsulação de probióticos	12
2.3.5 Fatores que afetam a eficiência de probióticos microencapsulados	13
2.3.6 A microencapsulação de probióticos e pespetivas.....	13
2.4 Azeitona de mesa	14
2.4.1 A composição do fruto e os benefícios para a saúde humana	14
2.4.2 Fermentação.....	15
2.4.3 Cultivares portuguesas para preparação de azeitona de mesa	16
2.4.4 Norma Portuguesa (NP-3034) aplicável à azeitona de mesa	17
2.5 Pasta de Azeitona	18
3. Material e métodos.....	21
3.1 Avaliação do potencial probiótico das estirpes de bactérias lácticas	21
3.1.1 Estirpes bacterianas e linha celular Caco-2	21
3.1.2 Condições de cultura	22
3.1.2.1 Bactérias lácticas.....	22
3.1.2.2 Bactérias patogénicas.....	22
3.1.2.3 Linha celular Caco-2.....	23
3.1.2.4 Viabilidade celular	23
3.1.3 Critérios de segurança para seleção de estirpes probióticas	23
3.1.3.1 Atividade hemolítica e mucinolítica	23
3.1.4 Critérios de funcionalidade para seleção de estirpes probióticas	24
3.1.4.1 Resistência ao processo de digestão simulada	24

3.1.4.2	Atividade antimicrobiana frente a bactérias patogênicas	27
3.1.4.3	Capacidades de auto-agregação e de co-agregação	27
3.1.4.4	Aderência a células Caco-2.....	28
3.2	Microencapsulação de bactérias lácticas	29
3.3	Caraterização física das cápsulas	29
3.4	Efeito do tratamento térmico.....	29
3.5	Produção da pasta de azeitona.....	30
3.5.1	Caraterização da pasta de azeitona	30
3.5.1.1	Determinação do pH e acidez	30
3.5.1.2	Determinação dos parâmetros de cor	31
3.5.2	Avaliação sensorial da pasta de azeitona.....	32
3.6	Análise estatística.....	32
4.	Resultados e discussão	33
4.1	Avaliação do potencial probiótico das estirpes de bactérias lácticas	33
4.1.1	Critérios de segurança para seleção de estirpes probióticas	33
4.1.1.1	Atividade hemolítica e mucinolítica	33
4.1.2	Critérios de funcionalidade para seleção de estirpes probióticas	35
4.1.2.1	Resistência ao processo de digestão simulada	35
4.1.2.2	Atividade antimicrobiana frente a bactérias patogênicas.....	38
4.1.2.3	Capacidade de auto-agregação e co-agregação.....	39
4.1.2.4	Aderência a células Caco-2.....	41
4.2	Microencapsulação de bactérias lácticas	42
4.3	Caraterização física das cápsulas	46
4.4	Efeito do tratamento térmico.....	47
4.5	Produção da pasta de azeitona.....	49
4.5.1	Caraterização da pasta de azeitona	52
4.5.1.1	Determinação do pH e da acidez.....	52
4.5.1.2	Determinação dos parâmetros de cor	53
4.5.2	Avaliação sensorial da pasta de azeitona.....	54
5.	Conclusão.....	57
6.	Perspetivas Futuras.....	59
7.	Referências bibliográficas	61

Índice de figuras	Pág.
Figura 3.1 Representação esquemática do ensaio <i>in vitro</i> para simulação das condições gastrointestinais	26
Figura 4.1 Atividade hemolítica dos isolados testados, usando como controlo positivo o <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 no centro de cada placa	33
Figura 4.2 Atividade mucinolítica dos isolados, usando como controlo positivo as estirpes <i>Escherichia coli</i> ATCC8739 e <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC14028, com formação de um halo claro em torno das colónias	34
Figura 4.3 Capacidade de auto-agregação (%) das estirpes de <i>Lactobacillus</i> spp.	39
Figura 4.4 Capacidade de adesão a células Caco-2 (%) das estirpes de <i>Lactobacillus</i> spp.	41
Figura 4.5 Sobrevivência das estirpes durante o período de armazenamento à temperatura de 4 °C, após microencapsulação pelo método de extrusão	43
Figura 4.6 Sobrevivência das estirpes durante o período de armazenamento à temperatura de 22 °C, após microencapsulação pelo método de extrusão	44
Figura 4.7 Seleção da estirpe e temperatura, após 30 dias de armazenamento das bactérias encapsuladas pelo método de extrusão a 4 °C e 22 °C	44
Figura 4.8 Cápsulas preparadas com alginato de sódio e amido	46
Figura 4.9 Morfologia externa das cápsulas preparadas com alginato de sódio e amido	46
Figura 4.10 Viabilidade das células livres e encapsuladas após diferentes tratamentos térmicos	48
Figura 4.11 Pasta de azeitona	49
Figura 4.12 Viabilidade celular da estirpe 33 nas formas encapsulada e livre incorporada na pasta de azeitona durante 30 dias de armazenamento	50
Figura 4.13 Determinação da cor na pasta de azeitona	53
Figura 4.14 Parâmetros sensoriais da pasta de azeitona contendo bactérias encapsuladas (P) e não encapsuladas (NP), após 30 dias de armazenamento	55

Índice de tabelas	Pág.
Tabela 3.1 Estirpes selecionadas para avaliação do potencial probiótico	21
Tabela 3.2 Estirpes patogénicas selecionadas para avaliação antagonista	22
Tabela 4.1 Viabilidade (Log10 (UFC/ml)) das estirpes de <i>Lactobacillus</i> spp. após exposição a condições simuladas do estômago e intestino	37
Tabela 4.2 Atividade antimicrobiana das estirpes de <i>Lactobacillus</i> spp. frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas	38
Tabela 4.3 Capacidade de co-agregação (%) das estirpes de <i>Lactobacillus</i> spp com potenciais patogénicos intestinais	40
Tabela 4.4 Valores de pH e acidez (expressa em % de ácido láctico) determinados na pasta de azeitona	52
Tabela 4.5 Parâmetros de cor determinados na pasta de azeitona	53
Tabela 4.6 Avaliação sensorial da pasta de azeitona ‘probiótica’	54

Abreviaturas

PCR- Polymerase Chain Reaction

MRS- De man, Rogosa, Sharpe

TSB - Tryptone Soya Broth

ATCC- American Type Culture Collection

ITQB - Instituto de Tecnologia Química e Biológica

FMT – Food Microbial Technology

PBS- Phosphate Buffer Saline

DO – Densidade optica

PCA- Plant count agar

LBS agar- Lactobacillus selection agar

1. Enquadramento e objetivo

Nas últimas décadas, o desenvolvimento e o consumo de alimentos probióticos aumentou substancialmente devido ao reconhecimento dos seus efeitos benéficos na promoção da saúde (Salminen *et al.*, 1998).

Os probióticos exercem várias funções, nomeadamente na prevenção de diarreias provocadas por certas bactérias patogénicas e vírus, através da inibição do seu crescimento e aderência à parede gastrointestinal, redução do efeito nefasto do uso de antibióticos, estimulação do sistema imunitário, redução do colesterol, reforço das propriedades anticarcinogénicas, aumento da atividade da microbiota intestinal contra reações alérgicas (no caso da intolerância à lactose) e, também, proteção do aparelho urinário (Salminen *et al.*, 1998).

Tradicionalmente, as bactérias lácticas probióticas têm a sua origem no leite e nos produtos lácteos fermentados. Como resultado da tendência natural para a diversificação de produtos, a indústria alimentar vem direcionando os seus interesses para os alimentos de origem não láctica que possam também contribuir para o consumo frequente de probióticos, principalmente por indivíduos com intolerância à lactose (Prado *et al.*, 2008). A introdução no mercado de novos probióticos, incluídos em alimentos ou em preparações orais para uso clínico, tem aumentado exponencialmente. Daí que, mais recentemente, as matrizes vegetais constituam uma fonte alternativa de microrganismos pertencentes ao género *Lactobacillus*. Estudos recentes indicam que a azeitona fermentada constitui um veículo biológico de interesse para estirpes lácticas com potencial probiótico que resistem às condições extremas do aparelho gastrointestinal sendo mesmo capazes de colonizá-lo (Lavermicocca *et al.*, 1998; Brito *et al.*, 2007).

A identificação de potenciais bactérias probióticas com origem na azeitona de mesa é um aspeto relevante para a revalorização da dieta mediterrânica e abre caminho para a classificação da azeitona de mesa como alimento funcional constituindo, sem dúvida, uma saída para novos produtos, cuja produção complementarará o mercado com produtos de valor acrescentado. Por outro lado, sendo de origem vegetal, apresentam menor probabilidade de contacto com animais e/ou humanos, pelo que se torna reduzida a probabilidade de aquisição de genes de resistência a antibióticos a partir de bactérias comensais ou patogénicas.

Os produtos são selecionados por consumidores cada vez mais exigentes e mais despertos para níveis de qualidade elevados. Por isso, importa produzir bem e produzir bens diferenciáveis com valor acrescentado.

Este estudo enquadra-se no projeto da Fundação para a Ciência e Tecnologia, *NEW PROTECTION*: efeitos de estirpes probióticas nativas e selvagens em azeitonas (PTDC/AGR-ALI/117658/2010).

Assentando no objetivo principal deste trabalho, produção de uma pasta de azeitona probiótica, são de considerar como objetivos específicos:

- Avaliação do potencial probiótico de estirpes de *Lactobacillus* spp. isoladas de azeitona fermentada da cultivar Galega;
- Microencapsulação de bactérias na pasta de azeitona e estudo da sua viabilidade celular.

Neste sentido, esta tese é dividida em sete partes: **Enquadramento e Objetivo**, em que é feito o enquadramento do trabalho e a sua estrutura, **Introdução**, onde são introduzidos os conceitos teóricos que fundamentam este trabalho, **Material e Métodos**, onde é descrita a metodologia e o material usado neste estudo, **Resultados e Discussão**, onde são apresentados os resultados deste trabalho e respetiva discussão, **Conclusão**, onde resumidamente são apresentadas as considerações importantes a reter deste estudo e **Perspetivas Futuras** onde se referem os pontos relacionados com o tema a desenvolver futuramente.

2. Introdução

2.1 Probióticos

2.1.1 Definição

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (WHO) (FAO/WHO, 2002) define probióticos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”. Por outras palavras, os probióticos constituem um suplemento alimentar rico em microrganismos vivos com efeito benéfico no hospedeiro/consumidor, ao melhorar ou manter o balanço microbiano intestinal (Fuller, 1989).

O termo “probiótico” inclui uma ampla gama de bactérias lácticas (BL), do género *Lactobacillus* (*acidophilus*, *brevis*, *fermentum*, *gasseri*, *johnsonii*, *paracasei*, *plantarum*, *rhamnosus* e *salivarius*), *Bifidobacterium* (*adolescentis*, *animalis*, *bifidum*, *breve*, *infantis* e *longum*), *Streptococcus* (*thermophilus* e *salivarius*) e *Enterococcus* (*faecium*) (Sanders *et al.*, 2007). As BL são consideradas os microrganismos probióticos mais importantes por terem um efeito benéfico no trato gastrointestinal. Estas bactérias, não formadoras de esporos, assumem-se como Gram-positivas, ácido-tolerantes e catalase negativas (Holzapfel *et al.*, 2001; Anal e Singh, 2007).

Bactérias não lácticas como *Escherichia coli* e organismos não bacterianos como leveduras, *Saccharomyces cerevisiae*, poderão também ser descritas como microrganismos probióticos (Sanders *et al.*, 2007).

Relativamente aos efeitos benéficos na saúde do consumidor, a *International Dairy Federation*, recomenda que devem ser ingeridas pelo menos 10^7 UFC/g de células viáveis diariamente (Ouwehand e Salminen, 1998). No entanto, a FAO/WHO (2003) sugere como padrão mínimo de consumo em produtos lácteos probióticos o teor de 10^6 UFC/g de células viáveis.

2.1.2 *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*

As estirpes probióticas mais conhecidas pertencem ao género *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Rokka e Rantamaki, 2010). Tradicionalmente usadas em alimentos fermentados, os *Lactobacillus* constituem um grupo heterogéneo de bactérias fermentativas estritas, produtoras de ácido láctico (Rokka e Rantamaki, 2010; Anal e Singh, 2007). As espécies mais comuns encontradas no intestino humano, são o *Lactobacillus acidophilus*,

Lactobacillus salivarius e *Lactobacillus casei* (Dunne *et al.*, 1999). Devido à resistência ao ácido e à bÍlis, atividade antimicrobiana e sobrevivência no trÁnsito gastrointestinal, o *Lactobacillus acidophilus* é o mais usado em preparações probióticas (Dunne *et al.*, 1999). O *Lactobacillus salivarius* é conhecido pela sua resistência ao ácido e à bÍlis mas também pela boa capacidade de aderência às células epiteliais do trato gastrointestinal (Vuyst *et al.*, 2004).

As *Bifidobacterium* residem geralmente no intestino grosso. Estritamente anaeróbias, Gram-positivas, crescem em meios com pH de 4,5-8,5 (Rokka e Rantamaki, 2010). O produto final da fermentação são o ácido láctico e o ácido acético (Anal e Singh, 2007). As *Bifidobacterium longum*, *B. infantis* e *B. breve* presentes no cólon, são frequentemente usadas como culturas probióticas (Vuyst *et al.*, 2004).

2.1.3 Efeitos benéficos na saúde

Embora nem sempre do conhecimento do consumidor, os probióticos são microrganismos considerados como seguros (GRAS) e estão geralmente associados a produtos lácteos fermentados (Wassenaar e Klein, 2008). Iogurtes e alguns tipos de leite (leite fermentado) constituem os produtos mais comuns; também podem ser considerados como probióticos outros alimentos como chucrute, pão, salame, alguns sumos e bebidas de soja.

Os microrganismos probióticos desempenham um importante papel terapêutico ou preventivo, quando ingeridos nas doses e no tempo adequado. São reconhecidos efeitos benéficos (FAO/WHO, 2001; Marteau *et al.*, 2001; Parvez *et al.*, 2006) em:

√ Doenças associadas ao trato gastrointestinal

- prevenção de diarreia causada por algumas bactérias patogénicas e vírus
- controlo de infeções e complicações associadas a *Helicobacter pylori* (gastrite tipo B, úlcera péptica e cancro gÁstrico)
- tratamento de doenças inflamatórias do intestino (doença de Crohn)
- prevenção de alguns tipos de cancro (redução dos níveis de compostos carcinogénicos)
- controlo da obstipação
- tratamento de doenças hepáticas
- aumento da tolerância à lactose

√ Imunidade da mucosa

√ Doenças alérgicas

- √ Doença cardiovascular (síndromes isquêmicas do coração, diminuição do colesterol sérico e hipertensão)
- √ Distúrbios do trato urogenital (infecções urinárias).

2.1.4 Mecanismos de ação das bactérias probióticas

O sistema gastrointestinal humano constitui um ecossistema complexo, colonizado geralmente por bactérias de várias espécies. Este sistema permanece estéril até ao nascimento do indivíduo ocorrendo a primeira colonização aquando do contato com a vagina da mãe, microbiota fecal e meio ambiente (Alderbeth *et al.*, 2000). Um epitélio intestinal saudável é constituído pela microbiota intestinal cuja função passa por criar uma barreira contra a absorção de microrganismos patogénicos, bem como a de compostos nocivos através do lúmen do intestino (Heyman *et al.*, 1982; Holzapfel *et al.*, 1998). A ação dos probióticos baseia-se na capacidade de degradar componentes alimentares, na produção de certas vitaminas do tipo B, na produção de enzimas envolvidas no processo de digestão de algumas substâncias e ainda na capacidade de metabolizar substâncias cancerígenas (Holzapfel *et al.*, 1998).

A perda de integridade da mucosa intestinal varia com os indivíduos estando associada à idade, ao *stress*, à dieta e a certas terapias (Vinderola *et al.*, 2011). A suplementação da dieta com probióticos e prebióticos constitui uma alternativa a este problema, uma vez que permite assegurar a manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal. Quando ingeridos, estes suplementos ajudam a estabilizar a microbiota intestinal através da aderência e da colonização da mucosa, o que contraria a possibilidade de produção e de ligação de toxinas ou invasão das células epiteliais por bactérias patogénicas. Paralelamente, é sabido que os probióticos competem com as bactérias indesejáveis ao hospedeiro, competem pelos nutrientes disponíveis no nicho ecológico e ainda conseguem impedir a sua multiplicação através da produção de compostos antimicrobianos, nomeadamente as bacteriocinas. Os probióticos estimulam a resposta imunitária através da ativação de macrófagos, por aumento dos níveis de citocinas e imunoglobulinas (Saad, 2006). No cólon podem alterar favoravelmente a microbiota e podem também melhorar a saúde urogenital. Têm também a capacidade para contrariar o desenvolvimento do carcinoma do cólon por estímulo da resposta imunitária do hospedeiro e ligação a compostos com potencial carcinogénico, por indução de alterações qualitativas e quantitativas da microbiota intestinal envolvidas na produção de compostos cancerígenos, por alteração das condições físico-químicas do cólon e por efeitos na fisiologia do hospedeiro (Saad, 2006).

2.1.5 Critérios de seleção

No processo de seleção de probióticos deve ser considerada a segurança dos microrganismos, bem como os seus aspetos funcionais e tecnológicos (Saarela *et al.*, 2000; FAO/WHO, 2001).

2.1.5.1 Critérios de segurança

A segurança constitui o primeiro passo na seleção de estirpes probióticas e inclui a origem, a classificação (espécie e género) e a sua não virulência. A resistência aos antibióticos é também uma das características que deve ser tida em conta; esta resistência pode ser intrínseca à bactéria ou adquirida. A resistência intrínseca ocorre naturalmente e pode ser considerada como uma característica da espécie, enquanto a resistência adquirida se deve a mutações genéticas ou à aquisição de genes de outras bactérias. A não transmissão destes genes constitui outro aspeto importante a considerar em termos de segurança (Saarela *et al.*, 2000).

2.1.5.2 Critérios de funcionalidade

Em termos funcionais devem ser considerados, a sobrevivência às condições gastrointestinais, ou seja, a tolerância ao ácido, fluido gástrico e sais biliares. A sua persistência, aderência às células epiteliais do intestino e subsequente colonização, a atividade antagonista frente a bactérias patogénicas e as propriedades antimutagénica e anticarcinogénica têm sido também sugeridas como requisitos para ação probiótica (Saarela *et al.*, 2000).

a) Tolerância ao ácido

Os microrganismos probióticos têm sido incorporados numa variedade de produtos derivados do leite, iogurtes, queijos, gelados e sobremesas lácteas. No entanto, subsistem problemas relativos à sua baixa viabilidade no sistema gastrointestinal e no próprio alimento. O baixo pH do suco gástrico constitui uma barreira eficaz contra bactérias no trato gastrointestinal pelo efeito negativo na viabilidade celular e consequente prevenção da colonização bacteriana no intestino delgado; assim, a sobrevivência dos microrganismos probióticos à passagem do estômago e correspondente tolerância ao ácido é um requisito fundamental (Heatly e Sobala, 1993).

b) Resistência à bÍlis

A bÍlis, solução aquosa constituída por ácidos, colesterol, fosfolípidos e pigmentos, desempenha um importante papel na emulsificação, solubilização e digestão dos lípidos. Considerado um solvente biológico, são reconhecidas as suas propriedades antimicrobianas,

uma vez que as membranas das bactérias podem, por ela, ser dissolvidas (Hofmann e Roda, 1984; Begley *et al.*, 2006). A hidrólise dos sais biliares tem sido identificada e caracterizada em bactérias probióticas, assumindo-se como um dos critérios para seleção de estirpes probióticas (Begley *et al.*, 2006).

c) Aderência às células epiteliais do intestino

A capacidade de aderência das estirpes probióticas à superfície intestinal e subsequente colonização constitui um requisito importante para que se verifique uma ação probiótica (Tuomola e Salminen, 1998). Da aderência resulta uma interação entre a estirpe e a superfície da mucosa intestinal, promovendo os efeitos imunológicos e a exclusão competitiva de bactérias patogênicas (Saarela *et al.*, 2000).

d) Propriedade antagonista frente a bactérias patogênicas

A atividade antagonista frente a bactérias patogênicas decorre da produção, por parte das BL, de substâncias com propriedades antimicrobianas, como ácidos gordos, ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetilo, acetoina e bacteriocinas (Saarela, 2000).

A produção de ácidos além de reduzir o pH funciona como permeabilizador da membrana externa das bactérias Gram-negativas permitindo que outros compostos atuem de forma sinérgica com os ácidos (Alakomi *et al.*, 2000; Niku-Paavola *et al.*, 1999). Os ácidos orgânicos, penetram através da parede celular bacteriana e assim entram no citoplasma onde são expostos a um valor de pH próximo da neutralidade, dissociando-se e libertando H⁺ e aniões. Como resultado da acumulação de prótons, o pH interno diminui (Gauthier, 2002).

O peróxido de hidrogênio, produzido por BL, ao ser libertado para o meio ambiente, pode oxidar o grupo SH das proteínas da membrana das bactérias Gram-negativas ao qual são especialmente suscetíveis (Ray, 2004).

As bacteriocinas, proteínas geralmente de reduzida massa molecular, aumentam a permeabilidade da membrana citoplasmática das células alvo a uma variedade de cátions monovalentes (Na⁺, K⁺, Li⁺, Cs⁺, Rb⁺) o que conduz à destruição da força motriz dos prótons, dissipação do gradiente do pH transmembranar e eventualmente à morte celular (Oppegard, 2007; Simova *et al.*, 2009).

Todas estas substâncias conferem vantagens na competição com bactérias patogênicas ao promoverem a exclusão competitiva por parte das bactérias probióticas (Soomro *et al.*, 2002; Simova *et al.*, 2009). Este mecanismo de ação tem como princípio a competição entre duas espécies pelo mesmo nicho ecológico, em que uma espécie prevalece sob a outra (Viderola *et*

al., 2004). As bactérias probióticas aderentes podem impedir a ligação de bactérias patogênicas e simultaneamente removê-las do trato intestinal (Vine *et al.*, 2004).

A agregação entre microrganismos da mesma espécie (auto-agregação), ou entre espécies diferentes (co-agregação), constitui uma propriedade importante dos microrganismos probióticos. A auto-agregação aumenta o potencial de colonização dos microrganismos; através da co-agregação é formada uma barreira físico-química que impede a colonização de bactérias patogênicas (Collado *et al.*, 2007).

e) Propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas

As propriedades anticarcinogênicas associadas às bactérias probióticas são caracterizadas pela produção de compostos antimutagênicos, pela modulação de enzimas pró-carcinogênicas no intestino e pela supressão de tumores através de um mecanismo de resposta imunitária (Saarela, 2000).

2.1.5.3 Critérios tecnológicos

Anteriormente à fase de colocação no mercado, as estirpes probióticas devem ser testadas quanto à capacidade de resistir ao processamento industrial e de sobreviver e manter a sua funcionalidade durante a fase de armazenamento. Paralelamente, a sua incorporação nos alimentos não deve transmitir sabores estranhos ou mesmo alterar a textura dos alimentos (Saarela, 2000).

2.2 Prebióticos

Os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro ao estimular a proliferação e a atividade de bactérias benéficas. A inulina, as fibras e a oligofrutose são os prebióticos mais conhecidos; são resistentes à digestão na parte superior do trato intestinal, incluindo o intestino delgado, sendo subsequentemente fermentados no intestino grosso pelas bactérias que colonizam o cólon. Da fermentação das substâncias prebióticas resulta uma modulação da microbiota intestinal promovendo o predomínio de bifidobactérias e desempenhando, conseqüentemente, um papel primordial na fisiologia gastrointestinal (Roberfroid, 2001, FAO/WHO, 2001).

2.3 Microencapsulação

2.3.1 Definição e objetivos

A microencapsulação consiste na imobilização das células bacterianas no interior de uma matriz encapsulante, formando uma cápsula que deverá ser capaz de manter a sua integridade durante a passagem pelo trato gastrointestinal (Ding e Shah, 2009). Dependendo do material e da tecnologia utilizados, a cápsula formada resulta numa membrana fina semipermeável e esférica, envolvendo um núcleo com um diâmetro que varia de poucos micrómetros a 1 mm.

São reconhecidas várias aplicações das microcápsulas na indústria alimentar que incluem a estabilização do material do núcleo através do controlo de reações oxidativas que podem degenerar no desenvolvimento de sabores, cores ou odores estranhos e também a proteção do mesmo material em ambientes adversos como temperatura, humidade, pressão osmótica, tensão mecânica, atividade enzimática, componentes químicos e alterações de pH (Anal e Singh, 2007; Mortazavian *et al.*, 2007).

2.3.2 Materiais usados

Na tecnologia de microencapsulação são utilizados polímeros, tais como alginato, carragenina, goma, quitosano, amido e proteínas do soro de leite.

Alginato

O alginato é um polissacarídeo extraído de algas marinhas que apresenta vantagens, nomeadamente facilidade de formar matrizes de gel em torno das células bacterianas, sua não toxicidade, baixo custo e facilidade de manipulação (Burgain *et al.*, 2011). Sabe-se ainda que as matrizes elaboradas a partir de alginato originam cápsulas com diâmetro de 1-3 μm e com um tamanho de poros na sua superfície que não excede os 7 nm. São também conhecidas algumas desvantagens que residem na suscetibilidade a ambientes ácidos e na dificuldade de aplicação numa escala industrial (Mortazavian *et al.*, 2007).

A não resistência das cápsulas de alginato às condições gástricas pode ser compensada pela mistura de alginato com outros compostos poliméricos, nomeadamente o amido, ou pela aplicação de aditivos que permitam uma modificação a nível estrutural (Burgain *et al.*, 2011).

Carragenina

A carragenina é um polissacarídeo natural extraído de algas marinhas, sendo normalmente utilizado como aditivo alimentar (Anal e Singh, 2007). Para dissolver este polímero são necessárias temperaturas elevadas (60 - 80 °C) (Anal e Singh, 2007). Depois de ser atingida a temperatura entre 40 e 50 °C são adicionadas as células ao que se segue a gelificação à temperatura ambiente (Burgain *et al.*, 2011). As cápsulas formam-se quando em contato com uma solução de cloreto de potássio (KCl) (Anal e Singh, 2007).

A encapsulação de microrganismos probióticos usando carragenina mantém as bactérias viáveis; no entanto, os géis produzidos são frágeis (Burgain *et al.*, 2011).

Goma gelana e xantana

A goma gelana constitui um polissacarídeo obtido a partir de *Pseudomonas* spp. Para encapsular bactérias probióticas usa-se uma mistura de goma gelana e xantana o que faz reforçar a resistência das cápsulas a condições ácidas (Burgain *et al.*, 2011).

Quitosano

O quitosano é um polissacarídeo que pode ser isolado a partir de conchas de crustáceos, cutículas de insetos e membranas de fungos (Anal e Singh, 2007). É solúvel a pH inferior a 6, sendo necessário a presença de iões cálcio para o seu adequado revestimento (Mortazavian *et al.*, 2007). Devido à sua ineficácia em aumentar a viabilidade das células encapsuladas é essencialmente utilizado para o revestimento e não como material constituinte da cápsula, sendo também conhecidos os seus efeitos inibitórios sobre BL (Burgain *et al.*, 2011).

Amido

O amido constitui um componente alimentar que desempenha um papel importante na fisiologia e na funcionalidade do cólon. O amido resistente, considerado um prebiótico, não é digerido no intestino delgado por ação das amilases pancreáticas e atinge o cólon onde sofre uma fermentação por ação da microbiota intestinal (Anal e Singh, 2007; Burgain *et al.*, 2011). O amido resistente pode ainda reduzir o risco de carcinoma do intestino (Mortazavian *et al.* 2007).

Proteínas do soro de leite

As proteínas de leite, além de propriedades estruturais e físico-químicas específicas, apresentam boa capacidade de gelificação. São totalmente biodegradáveis e constituem um bom componente para usar no processo de encapsulação (Burgain *et al.*, 2011; Ariful *et al.*, 2010).

2.3.3 Métodos de dispersão

Os métodos mais comuns usados para proteger as bactérias probióticas consistem na microencapsulação e baseiam-se no aprisionamento das bactérias numa matriz de gel por técnicas de extrusão, emulsão, secagem por atomização e liofilização (Champagne e Fustier, 2007).

Extrusão

A extrusão constitui a técnica mais comum para conversão de hidrocolóides em microcápsulas (King, 1995). De um modo geral, trata-se de um método simples, barato e de operações suaves com lesões celulares mínimas (Mortazavian *et al.*, 2007).

Os microrganismos são adicionados a uma solução hidrocolóide e, de seguida, são incorporados em forma de gotículas numa solução de cloreto de cálcio para endurecimento. O tamanho das cápsulas formadas depende da viscosidade da mistura, do diâmetro do orifício de gotejamento e da distância entre a sua saída e a solução de endurecimento, podendo variar de 0,5-3 mm (Heidebach *et al.*, 2012; Rokka e Rantamaki, 2010). No entanto, outros autores sugerem que o diâmetro das cápsulas originadas por este método pode variar de 2 a 4-5 mm (Mortazavian *et al.*, 2007; Rokka e Rantamaki, 2010). A composição do alginato também influencia o tamanho das cápsulas (Krasaekoopt *et al.*, 2003).

O material encapsulado é totalmente coberto e protegido por material encapsulante e o material residual deverá ser removido (Gibbs *et al.*, 1999; Desai e Park, 2005). Este é um passo importante a ter em conta pois a presença de material residual nas cápsulas pode conferir ao alimento propriedades sensoriais indesejáveis.

Apesar da elevada viabilidade celular obtida, este método não pode ser utilizado em produção de larga escala devido ao elevado tempo para a formação das cápsulas (Mortazavian *et al.*, 2007).

Emulsão

O método de emulsão tem sido aplicado com sucesso no processo de microencapsulação de BL (Mortazavian *et al.*, 2007). Consiste na emulsão de uma solução hidrocolóide aquosa que constitui a fase descontínua, numa solução de maior volume de óleo vegetal, ou fase contínua. O endurecimento das cápsulas resulta da adição, sob agitação magnética, de uma solução de cloreto de cálcio (Heidebach *et al.*, 2012). As cápsulas são de menor dimensão, quando comparadas com as do método de extrusão, sendo mais fácil de

dimensionar em termos industriais (Mortazavian *et al.*, 2007). O tamanho das cápsulas depende da homogeneização e da velocidade de agitação, podendo variar de 20-25 µm a 2 mm (Krasaekoopt *et al.*, 2003; Rokka e Rantamaki, 2010). Em termos de custos, este método é mais dispendioso pela necessidade do uso de óleo vegetal em quantidades apreciáveis (Mortazavian *et al.*, 2007).

Secagem por atomização (*spray-drying*)

A secagem por atomização é um processo muito utilizado na indústria alimentar que consiste na conversão de líquidos em pós secos, sendo utilizado não só para secagem mas também para encapsulação de bactérias probióticas (Heidebach *et al.*, 2012). A técnica consiste em converter uma dispersão líquida num produto seco através da aspersão do líquido em contato com o ar quente numa câmara de secagem para abreviar a secagem (Conte *et al.*, 1994). Com este processo são produzidas cápsulas de diâmetro inferior a 100 µm, a custos reduzidos. Além da rapidez do procedimento, esta técnica é altamente reprodutível e adequada para aplicações industriais (Burgain *et al.*, 2011). No entanto, a rápida desidratação durante a secagem conduz geralmente a uma alteração que resulta em perdas significativas de células viáveis e numa menor resistência destas a condições desfavoráveis (Heidebach *et al.*, 2012).

Liofilização

A liofilização é um processo alternativo para encapsular probióticos, uma vez que não requer baixas temperaturas durante o transporte não havendo também riscos associados à descongelação. Esta técnica não sendo um processo contínuo envolve, no entanto, um elevado custo de operação. No congelamento pode haver lugar à formação de cristais de gelo que danificam as membranas celulares das bactérias (Santivarangkna *et al.*, 2007).

2.3.4 Aplicação e vantagens da microencapsulação de probióticos

A microencapsulação é o processo que pode ser aplicado a culturas *starter* ou culturas de arranque com manutenção de viabilidade celular elevada e aumento, de forma eficiente, da resistência dos probióticos à passagem pelo trato gastrointestinal (Krasaekoopt *et al.*, 2004). Quando incorporadas em produtos alimentares, na forma de microcápsulas, as bactérias probióticas conservam a sua viabilidade até ao momento de consumo do produto. Por outro lado, as células conseguem atingir a taxa de atividade metabólica celular desejável e mantêm as suas propriedades sensoriais permanecendo elevada e controlável a viabilidade das bactérias na fase final do processo de fermentação (Mortazavian *et al.*, 2007). Como desvantagem, a produção de produtos fermentados usando bactérias encapsuladas implica custos mais elevados

devido ao longo período de incubação que exige e à necessidade de uso de grandes quantidades de inóculo (uma vez que não há células de multiplicação durante o processo de fermentação) (Mortazavian *et al.*, 2007).

Também é conhecida a sua aplicação em processos de fermentação. Os microrganismos são protegidos do efeito nefasto de compostos químicos e da possibilidade de sofrerem mutações genéticas; alcançam uma boa rentabilidade na produção de metabolitos especialmente quando em agitação rápida, como o caso do fabrico do iogurte, queijo e produtos lácteos congelados (Anal e Singh, 2007; Mortazavian *et al.*, 2007). A microencapsulação de probióticos ajuda a fixar e/ou melhorar as propriedades sensoriais do produto final sendo a acidez de um produto fermentado por bactérias microencapsuladas mais moderada. A inativação do metabolismo das bactérias encapsuladas conduz à fixação do sabor dos produtos não influenciando, portanto, o seu perfil de sabores especialmente durante o período de armazenamento (Mortazavian *et al.*, 2007).

2.3.5 Fatores que afetam a eficiência de probióticos microencapsulados

No processo de microencapsulação é fundamental selecionar o material adequado tendo em conta o ambiente onde vão ser aplicadas as cápsulas. Por exemplo, o alginato deve ser evitado em ambientes de elevada acidez e na presença de agentes quelantes. Sabe-se ainda que o aumento do diâmetro das cápsulas confere maior proteção contra fatores ambientais adversos; para melhorar a eficácia da encapsulação é uma prática comum proceder-se a alterações químicas dos materiais que formam as cápsulas (Mortazavian *et al.*, 2007).

Outros fatores, tais como a sequência/ordem da mistura dos constituintes durante o processo de microencapsulação, a proporção da mistura e as tensões mecânicas podem induzir fraturas nas cápsulas e afetar a eficácia do método (Mortazavian *et al.*, 2007).

2.3.6 A microencapsulação de probióticos e perspectivas

Sendo a seleção dos produtos feita pelos consumidores, cada vez mais exigentes e mais desportos para níveis de qualidade elevados, o seu comportamento é um dos aspetos importantes a considerar. Deste modo, o desenvolvimento de novos alimentos funcionais torna-se um grande desafio e as indústrias e laboratórios devem dispor de tecnologias economicamente viáveis passíveis de serem usadas a uma escala industrial.

A microencapsulação tem sido aplicada pela indústria com o objetivo de melhorar a resistência das células probióticas no trato gastrointestinal e prolongar a sua vida útil em

produtos alimentares. No entanto, a tecnologia de microencapsulação de probióticos tem ainda de enfrentar muitos desafios para uma aplicação eficaz à escala industrial. Um dos desafios passa pela redução do tamanho das cápsulas, por forma a não afetar negativamente a textura e as propriedades sensoriais do produto. No processo de emulsão que utiliza óleo vegetal, há que obviar a presença de óleo residual na superfície das cápsulas que prejudica a textura e as propriedades sensoriais do produto; além de dificultar a sua incorporação na dieta alimentar pode também tornar-se tóxico para as bactérias probióticas.

2.4 Azeitona de mesa

2.4.1 A composição do fruto e os benefícios para a saúde humana

A azeitona é um fruto rico em componentes nutritivos e saudáveis e, como consequência da fermentação, é enriquecido noutros nutrientes, nomeadamente em antioxidantes naturais de elevado valor biológico.

No fruto maduro a polpa constitui cerca de 65-92% do peso total e a correspondente composição média geral é, maioritariamente, água (50-70%), gordura ou azeite (15-30%), matéria azotada (2-5%), açúcares totais e redutores (4-10%), fibras (3-6%) e cinza ou matéria mineral (1-3%). São estes componentes que servem de nutrientes aos microrganismos da fermentação (Garrido-Fernández *et al.*, 1997).

Na fração lipídica da azeitona de mesa, que é dependente da cultivar e do estado de maturação do fruto, predominam os ácidos gordos monoinsaturados dos quais o ácido oleico é maioritário (\pm 80%). O teor em ácidos gordos saturados não ultrapassa 15% do total de lípidos (Sakoui *et al.*, 2008). A nível indicativo, a composição do azeite monovarietal de frutos da cultivar Galega vulgar é representada por cerca de 76,0% de ácidos gordos monoinsaturados, 6,0% de ácidos gordos polinsaturados e 18,0% de ácidos gordos saturados. É ainda caracterizado por elevados teores de esteróis totais (1700 mg/kg), com predomínio do β -sitosterol (95%), seguido do avenasterol (7%) e do campesterol (3%); os restantes fitosteróis não excedem 1% e os álcoois triterpénicos, eritrodiol e uvaol, apresentam teores médios de 1,2% (Pintado *et al.*, 2006). O principal açúcar livre presente na polpa é a glucose (1 a 3% do peso da polpa), seguido da frutose (0,1 a 1,1%) e de pequenas concentrações de xilose, sacarose e manitol. O teor de açúcares solúveis reduz ao longo do processo de maturação do fruto e constitui a principal fonte de energia e carbono para os microrganismos da fermentação da azeitona (Garrido-Fernández *et al.*, 1997).

Em relação ao valor calórico a azeitona de mesa fornece cerca de 250 Kcal/100g, o que corresponde a cerca de metade do que é normal em batatas fritas (560 Kcal/100g) ou no chocolate negro (534 Kcal/100 g) ou nos aperitivos açucarados. Constitui também uma importante fonte de fibras, vitaminas E, B1 e C, carotenos ou pró-vitamina A e ferro (Reto *et al.*, 2006a; Reto *et al.*, 2006b).

A azeitona é rica em compostos fenólicos constituídos por fenóis livres e seus glucosídeos, que representam 1 a 3% da polpa, com propriedades antioxidantes de elevado valor biológico; apresenta um teor mais elevado do que o azeite e de muitos outros frutos (Silva *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2007).

O processo de transformação da azeitona de mesa envolve necessariamente uma fermentação que potencia algumas das características acima referidas, características evidenciadas em estudos realizados com a cultivar Galega, onde se analisou a sua composição inicial e as alterações promovidas por ação microbiana (Oliveira *et al.*, 2004).

A azeitona de mesa é, assim, um alimento muito nutritivo e equilibrado. A sua promoção como alimento saudável é confirmada por resultados de estudos efetuados pelo *Instituto de La Grasa y Sus Derivados* em Espanha (Garrido-Fernández e Lopez-Lopez, 2008).

2.4.2 Fermentação

A fermentação da azeitona ocorre, geralmente, em três fases (Garrido-Fernandez *et al.*, 1997). Durante a primeira fase verifica-se a presença de uma grande diversidade de microrganismos proveniente do fruto, dos equipamentos e do meio ambiente. Nesta fase estão presentes algumas bactérias Gram-negativas pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, em quantidades relativamente elevadas. Estas espécies predominam durante os primeiros dois dias de fermentação e tendem a desaparecer com a progressiva redução dos valores de pH (Garrido-Fernandez *et al.*, 1997).

A segunda fase da fermentação inicia-se a pH 6 que se reduz progressivamente. É nesta etapa que as bactérias Gram-negativas tendem a desaparecer. Esta fase tem uma duração de 10 a 15 dias e é caracterizada pelo rápido crescimento de bactérias do género *Lactobacillus*, predominantemente *Lactobacillus plantarum* e, em menor proporção, *Lactobacillus pentosus* e algumas leveduras, como *Torulaspota delbrueckii*, *Debaryomyces hansenii* e *Cryptococcus laurentii* (Oliveira *et al.*, 2004); as leveduras complementam a capacidade dos lactobacilos para degradar compostos poliaromáticos e sintetizar vitaminas e aminoácidos. A associação bactéria e levedura promove uma alteração das vias metabólicas individuais e, conseqüentemente, os

correspondentes metabolitos por elas produzidos contribuindo para as peculiares características organoléticas do produto final (Damiani *et al.*, 1996).

A terceira fase da fermentação inicia-se quando a salmoura atinge um pH 4,5. Nesta fase a microbiota é predominantemente constituída por *Lactobacillus* spp. e leveduras. Estas produzem, entre outros compostos, etanol, acetaldeído e dióxido de carbono que contribuem para a caracterização do sabor do produto final. O processo de fermentação termina com o esgotamento dos açúcares.

2.4.3 Cultivares portuguesas para preparação de azeitona de mesa

De acordo com dados do Conselho Oleícola Internacional (C.O.I., 2008) as principais cultivares de oliveira Portuguesas são, Azeiteira ou Azeitoneira, Bical de Castelo Branco, Blanqueta, Borrenta, Carrasquenha, Cobrançosa, Coimbreira, Conserva de Elvas, Cordovil de Castelo Branco, Cordovil de Serpa, Galega vulgar, Galega grada de Serpa, Lentisca, Leucocarpa, Linguiceira, Maçanilha Algarvia, Madural, Mora, Negrinha de Freixo, Negrita, Redondal, Redondil, Santulhana, Verde Verdelho, Verdeal Alentejana e Verdeal Transmontana. Tradicionalmente, a cultivar mais importante em Portugal é a Galega (± 80 %) que é utilizada para a produção tanto de azeite como de azeitona de mesa. Algumas cultivares estão em declínio e mesmo em risco de extinção como a Conserva de Elvas, devido ao número cada vez menor de árvores existentes.

As variedades de azeitonas mais importantes em cada uma destas regiões produtoras são a Negrinha de Freixo, de Trás-os-Montes, Azeitoneira e Carrasquenha do Alentejo e a Cordovil e Galega da Beira Interior (C.O.I., 2007).

As cultivares Azeitoneira, Negrinha de Freixo, Santulhana e Conserva de Elvas, devido às suas propriedades estruturais, nomeadamente proporção polpa/caroço e facilidade de separação do caroço, volume e forma do fruto e textura da polpa, têm como única finalidade a sua utilização para conserva, enquanto todas as cultivares de dupla aptidão para além da produção de azeite podem também ser processadas como azeitona de mesa (Leitão *et al.*, 1986).

2.4.4 Norma Portuguesa (NP-3034) aplicável à azeitona de mesa

Definição, tipos de azeitona e preparações comerciais

Em Portugal vigora a Norma NP-3034 (2012) – Azeitonas de mesa. *Definição, classificação, características, acondicionamento e rotulagem*. A norma define as diferentes apresentações comerciais e estabelece as categorias de qualidade apropriadas.

A NP-3034 (2012) define azeitona de mesa como o produto preparado a partir de frutos de variedades apropriadas de *Olea europaea sativa* Hoffg Link, em estado de maturação adequado, submetidos a tratamentos e operações que assegurem as suas características e a boa conservação. De acordo com esta Norma, na escolha das variedades a utilizar deve ter-se em conta o volume e a forma do fruto, características da polpa, nomeadamente sabor, firmeza e facilidade de separação do caroço. Os frutos são tratados de modo a remover o seu amargor – solução alcalina de hidróxido de sódio e/ou lavagens sucessivas com água, e conservados por fermentação natural ou por tratamento térmico.

Existem diferentes tipos ou classificações de azeitona de mesa que dependem sobretudo do grau de maturação dos frutos, do processo de preparação das azeitonas e/ou da sua forma de apresentação. A classificação da azeitona de mesa é feita, portanto, com base no estado de maturação dos frutos frescos, estado esse que define o tipo de preparação, tendo em conta a sua cor: verde, mista e preta.

O tipo de preparação “azeitona curada” é preparado a partir de frutos no estado de maturação verde, mista ou preta, submetidos a um tratamento alcalino e de seguida acondicionadas em salmoura onde se desenvolve uma fermentação total ou parcial e finalmente conservadas ou não por agentes acidificantes.

A “azeitona ao natural” em salmoura verde, mista ou preta” é preparada a partir de frutos no estado de maturação verde, frutos de maturação intermédia (cor violácea). São posteriormente colocados em salmoura, onde sofrem um processo de fermentação parcial ou total e finalmente conservadas ou não por agentes acidificantes.

A “azeitona desidratada” é preparada a partir de azeitona verde, mista ou preta submetidas ou não a tratamento alcalino, conservadas em salmoura ou desidratadas em sal seco e/ou calor.

A “azeitona oxidada” é preparada a partir de frutos geralmente em estado de maturação intermédia (mista) ou verde conservado em salmoura. O adoçamento é feito por imersão em

solução diluída de hidróxido de sódio seguida de lavagens com água na qual se faz passar uma corrente de oxigénio. Este tipo de lavagem, em meio oxigenado, promove o enegrecimento dos frutos, por oxidação. Podem ou não sofrer um processo de fermentação. O produto final é conservado em recipientes herméticos fechados e submetidos a esterilização. A coloração preta dos frutos deve ser uniforme.

Para comercialização a Norma também define a azeitona de mesa de acordo com a sua forma de apresentação: inteiras, britadas, retalhadas, descaroçadas, em metades, em quartos, laminadas, em rodelas, em pedaços, partidas, recheadas, pasta de azeitona e outras.

2.5 Pasta de Azeitona

A pasta de azeitona resulta de azeitona de mesa moída, previamente tratada nos diferentes tipos anteriormente descritos. Podem ser produzidas de formas diferentes e utilizadas para integrar a elaboração de diversos pratos culinários.

De acordo com o C.O.I (1980), a pasta de azeitona tem por base polpa de azeitona moída, na qual podem incorporar-se ingredientes e aditivos para valorização e conservação do produto. Pelas suas propriedades particulares, os temperos e especiarias podem influenciar a composição e a qualidade das pastas. Sendo o azeite um dos ingredientes adicionados para lubrificação da polpa e para impedir a presença de bolsas de ar prevenindo a oxidação, este ingrediente potencia a composição em compostos fenólicos conhecidos pela sua atividade biológica e benefícios na saúde humana (Owen *et al.*, 2000; Visioli e Galli, 2001; Menéndez *et al.*, 2007). Paralelamente reforça o sabor tornando a pasta menos amarga e menos ácida. O alho, frequentemente utilizado, tem atividade biológica antimicrobiana e antioxidante (Queiroz *et al.*, 2009; Hughes *et al.*, 1991; Fujisawa *et al.*, 2008; Tajkarimi *et al.*, 2010; Aguirrezábal *et al.*, 2000; Bozin *et al.*, 2008; Janoszka, 2010) e reduz a ocorrência de doença cardíaca e do cancro (Thomson *et al.*, 2006; Ngo *et al.*, 2007; Omar e Al-Wabel, 2010).

O limão possui componentes naturais como ácido cítrico, ácido ascórbico, minerais, flavonóides e óleos essenciais (Vaio *et al.* 2010), o que ajuda na prevenção de doenças (Van Gils *et al.*, 2005).

O louro, utilizado para fins medicinais na asma, doença cardíaca e transtornos digestivos (Loi *et al.*, 2004; Dall'Acqua *et al.*, 2006; Bruni *et al.*, 1997) constitui uma fonte de compostos fenólicos com atividade antioxidante relevante (Rice-Evans *et al.*, 1996; Zheng e Wang, 2001).

Os orégãos têm compostos com propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antioxidantes (Elgayyar *et al.*, 2001; Sokovic *et al.*, 2002; Puertas-Mejia *et al.*, 2002). Devido aos seus efeitos biológicos podem ser utilizados no tratamento de distúrbios digestivos, perturbações menstruais e ainda infecções respiratórias e da pele (Vale-Silva *et al.*, 2012).

O pimentão-doce contém compostos fenólicos e vitaminas C e E. Possui atividade antioxidante, estimula o sistema imunológico, previne doença cardiovascular e retarda o envelhecimento (Bae *et al.*, 2012; Garcia-Closas *et al.*, 2004; Podsedek, 2007; Chuah *et al.*, 2008).

Na formulação das pastas de azeitona devem ser considerados vários aspetos por forma a obter-se um produto agradável que atenda as exigências do consumidor. Face a um consumidor mais exigente, torna-se importante que as empresas prestem ainda mais atenção à avaliação de atributos como cor, sabor, textura e aparência. Daí a importância do recurso à análise sensorial para perceção das suas características organoléticas, bem como aceitabilidade e preferência (Abdullah e Cheng, 2001). Também devem ser consideradas a avaliação da segurança e da qualidade nutricional dos produtos (Moskowitz *et al.*, 2005).

3. Material e métodos

3.1 Avaliação do potencial probiótico das estirpes de bactérias lácticas

3.1.1 Estirpes bacterianas e linha celular Caco-2

Para avaliação *in vitro* do potencial probiótico das estirpes foram inicialmente isoladas 156 estirpes de bactérias lácticas de processos de fermentação de azeitona de mesa preta ao natural, cultivar Galega. Estas estirpes do género *Lactobacillus* spp. foram previamente identificadas por métodos convencionais de microbiologia e métodos moleculares e foram avaliadas quanto à sua tolerância ao ácido e sais biliares. As estirpes que revelaram elevada tolerância a estes dois parâmetros foram selecionadas para este estudo. A identificação à espécie foi feita nos laboratórios da UNITO, em Milão, Itália pelo método multiplex-PCR recA Gene-derived usando *primers* específicos para as espécies *L. pentosus*, *L. plantarum* e *L. paraplantarum* (Torriani *et al.*, 2001). Desta primeira seleção resultaram 13 estirpes. Na tabela 3.1 apresentam-se as 13 estirpes que resultaram da primeira seleção.

A atividade antagonista das bactérias lácticas selecionadas foi avaliada recorrendo à coleção de culturas do Laboratório *Food Microbial Technology* do ITQB (Tabela 3.2):

Tabela 3.1 Estirpes selecionadas para avaliação do potencial probiótico.

Estirpe	Identificação
17.2b	<i>Lactobacillus plantarum</i>
B13	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
K	<i>L. paraplantarum</i>
B95	<i>L. plantarum</i>
O1	<i>L. paraplantarum</i>
69B	<i>Lactobacillus pentosus</i>
607	<i>L. plantarum</i>
P	<i>L. plantarum</i>
FF28	<i>L. plantarum</i>
33	<i>L. plantarum</i>
A1	<i>L. paraplantarum</i>
614	<i>L. plantarum</i>
B96	<i>L. pentosus</i>

Tabela 3.2 Estirpes patogénicas seleccionadas para avaliação antagonista.

Estirpe	Referência
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Salmonella thyphimurium</i>	ATCC 14028

A linha celular Caco-2 de adenocarcinoma do colon humano ACC169 (Coleção DSMZ, Alemanha) utilizada nos ensaios de aderência foi cedida pelo laboratório de Tecnologia de Células Animais (IBET, Oeiras, Portugal).

Em todos os ensaios foi usada, como estirpe probiótica de referência, o *Lactobacillus casei* Shirota (LCS) (ACA-DC 6002) (Yakult, Singapore, Japão) gentilmente cedida pelo Laboratório de Microbiology and Biotechnology da Food da Agricultural University of Athens (Iera Odos, Greece).

3.1.2 Condições de cultura

3.1.2.1 Bactérias lácticas

As estirpes seleccionadas, conservadas em glicerol a 40% (w/v), à temperatura de -20 °C, foram previamente repicadas (1% de inóculo, v/v) duas vezes (20 e 16 horas) para caldo MRS (Merck, Darmstadt, Alemanha), cultivadas em aerobiose a 37 °C. Após o segundo período de incubação, na fase final de crescimento exponencial as células encontram-se numa concentração de 10⁸ UFC/ml. A composição do meio MRS consiste (g/l) em: 10,0 g peptona de caseína, 8,0 g extrato de carne, 4,0 g extrato de levedura, 20,0 g glucose, 2,0 g hidrogenofosfato dipotássico, 1,0 ml Tween 80, 2,0 g citrato de hidrogénio diamónico, 5,0 g acetato de sódio, 0,2 g sulfato de magnésio, 0,04 g sulfato de manganês, pH 6,2.

3.1.2.2 Bactérias patogénicas

Todas as bactérias patogénicas foram cultivadas em meio líquido, TSB (Merck), com 1% de inóculo (v/v) para 20 e 16 horas, e incubadas em aerobiose a 37 °C. A composição do meio TSB consiste (g/l) em: 2,5 g glucose, 5,0 g cloreto de sódio, 2,5 g fosfato de potássio dibásico, 3,0 g farelo de soja, 17,0 g caseína.

3.1.2.3 Linha celular Caco-2

Os ensaios de aderência foram realizados com células diferenciadas entre as passagens nº 40-70, cultivadas em meio RPMI-1640 Glutamax (Gibco-BRL, Paisley, Inglaterra) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco-BRL) e 1% (v/v) de PenStrep (Gibco-BRL), mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de ar (Galaxy 170S, New Brunswick, EUA). O meio foi removido e substituído cada 48 h.

Após 90% de confluência, a concentração das células Caco-2 em monocamada foi determinada após tripsinização com uma solução de 0,05% (v/v) de Tripsina-EDTA (Gibco-BRL), a 37 °C, durante 10 minutos.

3.1.2.4 Viabilidade celular

Para determinar a viabilidade celular das bactérias lácticas procedeu-se, em cada ensaio, ao plaqueamento por incorporação de MRS Agar (Merck) da respetiva diluição e incubação a 37 °C, durante 48 horas.

A constituição do meio usado consiste (g/l) em: 10,0 g peptona de caseína, 10,0 g extrato de carne, 4,0 g extrato de levedura, 20,0 g glucose, 2,0 g hidrogenofosfato dipotássico, 1,0 ml Tween 80, 2,0 g citrato de hidrogénio diamónico, 5,0 g acetato de sódio, 0,2 g sulfato de magnésio, 0,04 g sulfato de manganés, 14,0 g agar.

A viabilidade celular da linha Caco-2 foi determinada recorrendo ao corante de azul de triptano (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, EUA). A 20 µl de suspensão celular adicionou-se 100 µl de uma solução a 1% (v/v) de azul de triptano. A suspensão corada foi colocada em hemacitómetro ou câmara de Neubauer, com profundidade de 0,200 mm e resolução de 0,0625 mm² (Fuchs-Rosenthal, Paul Marienfeld GmbH & Co., Lauda-Königshofen, Alemanha) e observada em microscópio invertido (Motic AE31, BC, Canadá).

3.1.3 Critérios de segurança para seleção de estirpes probióticas

3.1.3.1 Atividade hemolítica e mucinolítica

As estirpes de *Lactobacillus* spp. foram testadas quanto à sua capacidade hemolítica, por incubação em placas de meio Columbia Agar - 5% (v/v) adicionado de sangue de cavalo (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França), a 37 °C, durante 24 horas. O *Staphylococcus aureus*

ATCC 6538 e o *L. casei* Shirota foram usados como controlo positivo e negativo, respetivamente.

Para testar a capacidade mucinolítica, segundo o método de Fumiaki *et al.* (2010) modificado, foi inicialmente preparado um meio base suplementado com 1,5% (w/v) de agar (Becton Dickinson, NJ, EUA), 0,3% (w/v) de mucina gástrica de porco (HGM - type III, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) e 1% (w/v) de glucose.

Em cada placa foram inoculados 2 µl de cada cultura bacteriana em estudo. As placas foram incubadas em anaerobiose a 37 °C, durante 72 horas. Terminado o período de incubação, foi-lhe adicionado 0,1% (w/v) de uma solução de preto de amido (Merck) preparado em ácido acético 1,2 M, após repouso durante 30 minutos. Numa fase final efetuou-se uma lavagem com ácido acético 1,2 M. Os ensaios foram realizados usando como controlos positivos *Echerichia coli* ATCC 8739 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. O *L. casei* Shirota (LCS) foi incluído nas placas como controlo negativo.

3.1.4 Critérios de funcionalidade para seleção de estirpes probióticas

3.1.4.1 Resistência ao processo de digestão simulada (Adaptado de Palencia *et al.*, 2008)

Para simulação das condições gastrointestinais humanas foi definido um sistema contínuo e sequencial no qual as estirpes ensaiadas foram submetidas a diferentes valores de pH e à ação de várias enzimas e ao efeito de sais biliares na concentração e em períodos de tempo similares ao da digestão humana (Figura 3.1).

As estirpes em estudo foram inoculadas em 150 ml de caldo MRS (pH 6,2) (Merck). Após incubação foram feitas quatro réplicas independentes de 25 ml cada. Após centrifugação em Eppendorf 5430 R (Alemanha), a 5000 x g, 10 °C, durante 10 minutos, procedeu-se a duas lavagens das células com PBS (0,5M; pH 7; Merck), por adição de 35 ml de uma solução eletrolítica contendo 6,2 g/l de NaCl, 2,2 g/l de KCl, 0,22 g/l de CaCl₂ e 1,2 g/l de NaHCO₃, pH 6,2 (**G1**). Seguidamente foram adicionados 100 µl da mesma solução eletrolítica contendo 0,01% (w/v; concentração final) de Lisozima (Sigma-Aldrich) (**G2**).

Para simular o ambiente gástrico foram adicionados, a cada réplica, 3 ml de solução eletrolítica de pH 5 contendo 0,3% (w/v; concentração final) de pepsina (Sigma-Aldrich).

A curva de pH no estomago foi reproduzida por adição, a cada amostra, de HCl 1M, por forma a acertar-se o pH a 5,0, 4,1, 3,0, 2,1 e 1,8. Aliquotas de cada solução foram recolhidas após incubação sucessiva em banho termostaticado com agitação (P-Selecta, Unitronic-or, Espanha) a 37 °C, durante 20 minutos (**G3, G4, G5, G6 e G7**).

Para simular o ambiente intestinal, as amostras **G3, G4 e G5** foram ajustadas a pH 6,5 com uma solução 1M de NaHCO₃ e posteriormente foram adicionados 4 ml de solução eletrolítica (5 g/l de NaCl, 0,6 g/l de KCl e 0,3 g/l de CaCl₂ com pH 8,0) contendo 0,45% de sais biliares e 0,1% (w/v; concentração final) de pancreatina (Sigma-Aldrich). Simulando as condições do duodeno, após incubação a 37 °C, durante 120 minutos, foram retiradas alíquotas das respetivas amostras (**Gi3, Gi4 e Gi5**). Em cada etapa da digestão monitorizou-se a viabilidade celular por plaqueamento em MRS agar.

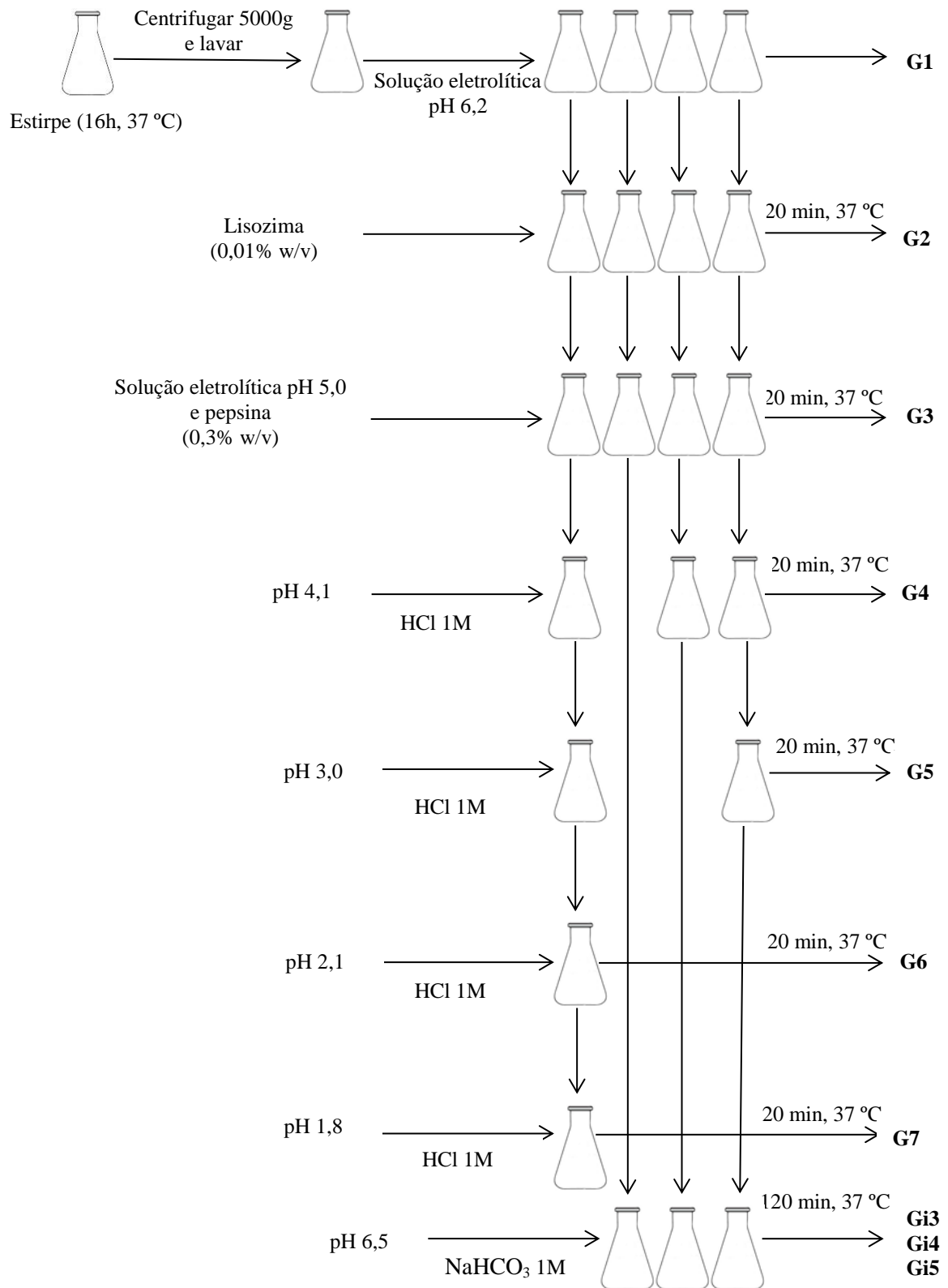


Figura 3.1 Representação esquemática do ensaio *in vitro* para simulação das condições gastrointestinais humanas.

3.1.4.2 Atividade antimicrobiana frente a bactérias patogénicas

A atividade antimicrobiana das bactérias lácticas em estudo foi avaliada de acordo com os métodos adaptados de Gu *et al.* (2008) e Guo *et al.* (2010). Após crescimento das estirpes em 10 ml de meio procedeu-se a centrifugação (5000 x g, 4 °C, 15 minutos). O sobrenadante isento de células foi concentrado por liofilização e posteriormente ressuscitado em 2 ml de PBS, a pH 7 (de modo a excluir o efeito de inibição por ácidos orgânicos). Antes da sua utilização, os sobrenadantes foram esterilizados por filtração (membranas de filtro 0,2 µm) (Bioline Global, Narellan, Austrália) e conservados a -20 °C.

Paralelamente, após crescimento das bactérias patogénicas procedeu-se à sua recuperação por centrifugação e duas lavagens com PBS. Para acerto da densidade ótica (DO_{600nm}) para 0,5 (aproximadamente 7x10⁸ UFC/ml) foram posteriormente ressuscitadas em PBS e feitas as leituras em espectrofotómetro UV/VIS (Jasco V-530, Japão). Uma alíquota 1% (v/v) de suspensão bacteriana foi inoculada em 10 ml de meio semi-sólido de Mueller-Hinton (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) com 0,8 % (w/v) de agar (Merck), permanecendo em repouso à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Após solidificação do meio, foram colocados nas placas discos de papel (6,0 mm, Oxoid) em posições previamente definidas sobre as quais se inocularam 8 µl do sobrenadante das bactérias lácticas a testar. Após incubação a 37 °C durante 24 horas, procedeu-se à medição dos halos de inibição recorrendo a um paquímetro (150 mm, Tajima, Japão).

3.1.4.3 Capacidades de auto-agregação e de co-agregação

Recorrendo aos métodos adaptados de Iñiguez-Palomares *et al.* (2007) e Del Re *et al.* (2000) foi feita a avaliação da capacidade de auto-agregação das estirpes por inoculação em 5 ml de MRS líquido (pH 6.2). Após incubação a 37 °C, as estirpes foram centrifugadas (5000 x g, 10 °C, 5 minutos) e foi retirado o sobrenadante para posterior utilização. As células foram submetidas a duas lavagens com PBS, sendo posteriormente ressuscitadas neste mesmo tampão para acerto da DO_{600nm} a 0,5. Para o teste de auto-agregação, foram centrifugados 5 ml de cada suspensão celular em PBS, foi eliminado o sobrenadante e as células foram ressuscitadas novamente no meio original. Após incubação a 37 °C, durante 2 horas, foi retirado da parte superior o volume de 1 ml e medida a DO_{600nm} (DO cultura). Após agitação, foi feita uma nova medição das respetivas DO (DO Total). A percentagem de auto-agregação foi calculada segundo a equação (Eq. 1):

$$A (\%) = [1 - (DO \text{ cultura} / DO \text{ total})] \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Para testar a capacidade de co-agregação das estirpes recorrendo aos métodos adaptados de El-Naggar (2004), Handley *et al.* (1987) e Taheri *et al.* (2009), após crescimento em 5 ml de meio de cultura apropriado, as bactérias lácticas e as bactérias patogénicas (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella thyphimurium* ATCC 14028 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644) foram recuperadas por centrifugação, subsequentemente lavadas duas vezes com PBS e ajustadas a uma DO_{600nm} de 0,5. Posteriormente procedeu-se à mistura de 0,5 ml de cada uma das culturas de bactérias lácticas com 0,5 ml de cultura de cada uma das bactérias patogénicas. Para controlo, utilizou-se 1 ml de suspensão de cada uma das espécies. Após homogeneização por agitação em *vortex* durante 10 segundos e incubação a 37 °C, durante 4 horas, foi feita uma leitura da DO da mistura bacteriana (DOc), dos controlos lácticos (DOa) e dos controlos patogénicos (DOb). A % de co-agregação foi calculada segundo a equação (Eq. 2):

$$\text{CoA (\%)} = \left(\frac{[(\text{DOa} + \text{DOb}) / 2 - \text{DOc}]}{[(\text{DOa} + \text{DOb}) / 2]} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

3.1.4.4 Aderência a células Caco-2 (Adaptado de Anderson *et al.*, 2010)

No ensaio de aderência, após as 16 horas de crescimento, as bactérias lácticas foram submetidas a centrifugação (5000 x g, 4 °C, 10 minutos) e duas lavagens com solução PBS. O *pellet* foi diluído adequadamente em meio RPMI-1640 (isento de soro fetal de bovino e de antibióticos) de modo a obter-se uma concentração celular de 10^8 UFC/ml.

Alíquotas de 2 ml contendo 1×10^4 células/ml foram inoculadas em placas de tecidos com 6 poços (9,5 cm²) (Falcon Microtest™, Becton Dickinson, Franklin Lakes NJ, EUA) e incubadas durante 2 semanas, até formação de uma monocamada completa de células.

Anteriormente à utilização das células Caco-2, foi-lhes retirado o meio de crescimento e submetidas a duas lavagens com 3 ml de solução PBS (pH 7,4). De seguida foram colocadas a incubar a 37 °C com 2 ml de RPMI-1640 (isento de soro fetal de bovino e de antibióticos), durante 1 hora. Após este período, a cada poço foi adicionado 1 ml de cada cultura bacteriana, inicialmente ressuspendida em meio RPMI. A co-incubação ocorreu em estufa (5% CO₂ / 95% ar) a 37 °C, durante 2 horas. No final da co-incubação, o meio foi retirado e a monocamada de células submetida a três lavagens com 1 ml de solução PBS. Depois de tripsinizar com uma solução de 0,05% (w/v) de Tripsina-EDTA, à temperatura ambiente, durante 15 minutos, as células foram removidas dos respetivos poços. Para quantificar as células aderentes foram

realizadas diluições seriadas da suspensão celular e respetivo plaqueamento em MRS agar. Os resultados foram expressos em % de aderência.

3.2 Microencapsulação de bactérias lácticas

Tendo em conta os resultados dos parâmetros acima analisados foram selecionadas duas estirpes de *L. plantarum* que evidenciaram os melhores resultados (33 e 17.2b).

Para os ensaios de microencapsulação recorreu-se aos métodos adaptados de Jayalalitha *et al.* (2012) e Krasaekoft *et al.* (2004); após crescimento as células foram centrifugadas (5000 x g, 4 °C, 15 minutos) e lavadas por duas vezes com solução PBS.

Para formação de cápsulas foram adicionados 20 ml da suspensão celular a 60 ml de uma solução contendo 2 % (w/v) de alginato de sódio e 0,5% (w/v) de amido de milho. A mistura foi homogeneizada durante 5 minutos em placa de agitação (Agimatic-HS, P-Selecta) e, posteriormente, foi adicionada a 100 ml CaCl₂ (0,1 M). Nesta fase, utilizou-se uma bomba peristáltica (Easy-Lad Masterflex, modelo 7518-00) a uma velocidade de 200 rpm acoplada a um tubo de 3 mm de diâmetro e colocado a uma altura de 30 cm. Após 30 minutos de repouso, procedeu-se a duas lavagens das cápsulas com água destilada estéril. Numa fase final, as cápsulas foram armazenadas a duas temperaturas, 22 e 4 °C, durante 30 dias; foi feita uma amostragem a cada 3 dias para estudo da viabilidade celular. Para o efeito, foi adicionado 1g de cápsulas a 99 ml de solução citrato de sódio a 1% (w/v) e pH 6, deixando-se em repouso a 37 °C, durante 10 minutos. A despolimerização foi feita num equipamento Stomacher (Seward, Stomacher 400 circulator) a 360 rpm, durante 3 minutos.

3.3 Caracterização física das cápsulas

Para determinar o diâmetro das cápsulas foram selecionadas, ao acaso, 30 unidades e medidas em microscópio invertido (objetiva 10x) através de um sistema de aquisição de imagem (Moticam 5.0 MP). Os resultados finais foram expressos em micrómetros (µm).

3.4 Efeito do tratamento térmico

Para testar o efeito do tratamento térmico na viabilidade celular das bactérias encapsuladas, seguiu-se o método descrito por Sabikhi *et al.* (2010). Foi inicialmente pesado, para frascos de vidro estéreis, 1g de cada cultura encapsulada (Schott Duran 100 ml, Alemanha) ao qual foram adicionados 10 ml de água destilada estéril (pH 6,4). Com recurso a uma placa de

aquecimento (Agimatic-N, Barcelona) e a um termómetro foi estudado o efeito na viabilidade celular a três temperaturas (72, 85 e 90 °C) durante 30 segundos. Terminado o tratamento térmico procedeu-se a um arrefecimento rápido, através da colocação de cada frasco em banho de gelo. Após despolimerização das cápsulas foram efetuadas diluições seriadas seguindo-se e respetivo plaqueamento para contagem de células viáveis, em meio MRS.

3.5 Produção da pasta de azeitona

A pasta de azeitona foi elaborada a partir de frutos de azeitona da cultivar Azeiteira, tipo verde ao natural. Depois de descaroçada e mantida em água durante 24 horas, as azeitonas foram pesadas e colocadas em recipiente adequado. Ao fruto foi-lhe adicionado 15% (w/v) azeite extra virgem, 5% (w/v) vinagre de vinho e 5% (w/v) de alho picado. A mistura foi homogeneizada num misturador durante alguns segundos e aquecida até fervura, durante 20 minutos, sendo colocada imediatamente num banho de gelo. Após o tratamento térmico e arrefecimento, foram retiradas amostras de pasta para plaqueamento em diferentes meios, LBS (Merck), PCA (Merck) e MRS.

Garantida a inocuidade da pasta, adicionou-se um inóculo de 10% de bactérias (33 e LCS) encapsuladas e livres, homogeneizando e conservando a 4 °C durante 30 dias. Foram retiradas amostras a cada três dias para estudo da viabilidade celular das estirpes inoculadas. Paralelamente, para caracterização da pasta, retiraram-se amostras antes da inoculação e no final do período de armazenamento.

3.5.1 Caracterização da pasta de azeitona

3.5.1.1 Determinação do pH e acidez

O valor de pH da pasta foi determinado recorrendo a um eletrodo de sólidos (Crison 5233, Espanha). O medidor de pH foi inicialmente padronizado com as soluções tampão de pH 7,0 e pH 4,0.

Para determinar a acidez, segundo a norma portuguesa NP-1421 (1977), com algumas modificações, pesou-se 10 g de pasta de azeitona para um erlenmeyer e adicionou-se 50 ml de uma solução de álcool e éter na proporção de 1:1. Agitou-se à temperatura ambiente durante 30 minutos e filtrou-se a amostra para um balão de 50 ml, perpez-se o volume do balão com a mesma solução. Do balão mediu-se 10 ml de amostra, procedendo-se a uma titulação com uma solução de 0,1 M de hidróxido de sódio (NaOH), usando a fenolftaleína como indicador.

A acidez foi expressa em porcentagem de ácido láctico e determinada pela equação (Eq. 3):

$$\text{Acidez (\%)} = [(0,1 \times V \times 0,09)/20] \times 100$$

(Eq. 3)

Sendo que, V corresponde ao volume de NaOH gasto.

3.5.1.2 Determinação dos parâmetros de cor

As alterações nos parâmetros de cor foram avaliadas no início e no fim do período de armazenamento da pasta de azeitona conservada à temperatura de 4 °C, através de três coordenadas (L*, a*, b*).

Segundo Girolami *et al.* (2013), Alsfshari-Jouybari e Farahnaky (2011), Yam e Papadakis (2004), Mendoza *et al.* (2006) para determinar as coordenadas (L*, a*, b*) utilizou-se uma câmara fotográfica digital para obtenção de imagem (Olympus Digital Camera model E-510) e um *software* específico para processamento e análise de imagem (Adobe Photoshop CS6). Para o efeito foi construída uma câmara escura em madeira, munida de iluminação no seu interior, através do posicionamento paralelo e em ângulo de 45° de 2 lâmpadas (temperatura 4000 K); a sua distância à amostra a analisar é de 30 cm. Foi feita a configuração da câmara fotográfica digital, também colocada a uma distância de 30 cm da amostra como segue: Fpoint- f/8, tempo de exposição - 1/50 s; velocidade ISO - 800; exposição de compensação - 0 step; distância focal - 42 mm; abertura máxima - 3.61328125; tipo de medição- foco; programa de exposição- *aperture priority*; saturação - elevada; balanço dos brancos- manual; dimensão de imagem - 3648x2736; resolução - 314 ppp; e profundidade - 24 bits. Após obtenção da imagem, esta foi guardada em modo *raw* e foi usada uma placa com diferentes cores (Prodisk mini, Modelo PD202) para calibração da imagem através do *software*. Posteriormente, foram definidos alguns parâmetros: temperatura - 40 detalhe - 25; cor - 25; detalhe de cor - 50; luminância: vermelhos - +20, verdes - 40, magentas - +7 e vermelhos saturados - +30, verdes - +10, azuis -10; tons magenta - +50.

A diferença total de cor no início e no fim do período de armazenamento da pasta nas coordenadas L*, a*, b* foi determinada pela seguinte fórmula (Eq. 4):

$$\Delta E_{Lab} = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

(Eq.4)

Sendo que, ΔL é dado pela diferença do valor L, final e inicial, Δa pela diferença do valor de 'a', final e inicial e Δb pela diferença do valor de 'b', final e inicial.

3.5.2 Avaliação sensorial da pasta de azeitona

Com esta prova pretendeu verificar-se o grau de aceitação da pasta azeitona, no final do período de armazenamento. Neste sentido, recorreu-se ao método sensorial afetivo.

A prova decorreu numa sala com iluminação, temperatura e humidade adequadas. As amostras foram codificadas com letras e a avaliação envolveu a participação de um painel de 9 provadores com experiência.

Durante a prova foram disponibilizadas as diferentes pastas, pedaços de maçã descascada, um copo com água, guardanapos, a respetiva folha de prova e esferográfica.

Foi solicitada a classificação da pasta de azeitona em termos de aceitação nos seguintes parâmetros: Aparência, Cor, Sabor, Textura, Granulosidade, Cheiro, Apreciação Geral e Intenção de Compra. Para tal, foi apresentada uma escala hedónica de 9 pontos, onde 1 indica o nível mínimo de aceitação, correspondente a 'desgosto extremamente' e 9 o nível máximo de aceitação 'gosto extremamente'. Cada amostra foi submetida a prova em triplicado, para cada provador.

3.6 Análise estatística

Os dados obtidos em todos os ensaios, foram analisados usando o *software* SPSS 20.0 (SPSS, Chicago, IL, EUA), através de uma análise de variância (one-way ANOVA). As diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as médias foram determinadas recorrendo ao teste Tukey. Para cada estirpe foram realizados três ensaios independentes ($n = 3$) com duas réplicas cada.

4. Resultados e discussão

4.1 Avaliação do potencial probiótico das estirpes de bactérias lácticas

4.1.1 Critérios de segurança para seleção de estirpes probióticas

4.1.1.1 Atividade hemolítica e mucinolítica

A atividade hemolítica resulta na capacidade de destruição das hemácias, por hemolisinas, com liberação de hemoglobina no plasma e está associada à patogenicidade de enterobactérias (Takeshi *et al.*, 1988).

A ausência de halo em torno das colônias evidencia atividade não hemolítica (γ -hemólise); os eritrócitos permanecem íntegros, não ocorrendo a hemólise. Por oposição, a presença de um halo esverdeado (α -hemólise) ou transparente (β -hemólise) sugere a lise parcial ou total das hemácias (Maragkoudakis *et al.*, 2009; Argyri *et al.*, 2013).



Figura 4.1 Atividade hemolítica dos isolados testados, usando como controlo positivo o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 no centro de cada placa.

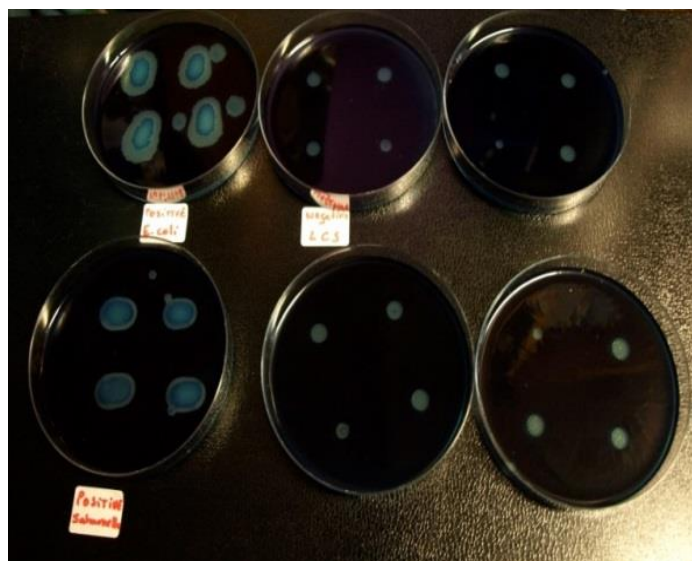


Figura 4.2 Atividade mucinolítica dos isolados testados, usando como controle positivo as estirpes *Escherichia coli* ATCC8739 e *Salmonella typhimurium* ATCC14028, com formação de um halo claro em torno das colônias.

Nenhuma das estirpes de *Lactobacillus* spp. ensaiadas evidenciou atividade α -hemolítica ou β -hemolítica (Figura 4.1), quando crescidas em meio Columbia agar. Tendo em conta que a ausência da atividade hemolítica constitui um dos critérios para seleção de estirpes probióticas, estes resultados sugerem que as bactérias testadas não são virulentas, podendo ser usadas como inóculo ou cultura de arranque em produtos alimentares (Anas, 2008; De Vuyst *et al.*, 2003; Mami *et al.*, 2008). Estes resultados estão de acordo com os descritos por Mami *et al.* (2008), onde também foi evidenciada a ausência de atividade hemolítica em estirpes de *Lactobacillus* spp. isolados de leite de cabra cru.

A mucosa gastrointestinal (camada de muco que reveste a superfície do trato gastrointestinal) desempenha um papel de barreira física importante para a prevenção da invasão de agentes patogênicos em órgãos e tecidos. Qualquer alteração desta estrutura irá comprometer as suas funções de barreira podendo originar doenças, como cancro do cólon e do reto e pólipos com caráter benigno. A produção de enzimas que degradam a mucina é sugerida como um critério de virulência e a sua ausência constitui um marcador de segurança para caracterização de novas estirpes potenciais probióticas (Zhou *et al.*, 2001).

A atividade mucinolítica foi pesquisada através da formação de um halo claro em torno das colônias, característico da degradação da mucina (Fumiaki *et al.*, 2010). Nenhuma estirpe de *Lactobacillus* spp. mostrou possuir capacidade para degradar a mucina *in vitro*, enquanto no mesmo ensaio as estirpes *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, usadas como controlos positivos, evidenciaram um comportamento evidente de degradação da

mucina (Figura 4.2). Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Zhou *et al.* (2001), Fernández *et al.* (2005) e Abe *et al.* (2010) em estirpes potenciais probióticas: *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis* e *bifidobacteria* (*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium infantis*), em que não foi observada a degradação da mucina *in vitro*.

4.1.2 Critérios de funcionalidade para seleção de estirpes probióticas

4.1.2.1 Resistência ao processo de digestão simulada

Este estudo teve como objetivo avaliar a tolerância das estirpes em estudo, às condições do trato gastrointestinal humano, permanecendo em contato com soluções com diferentes valores de pH e enzimas digestivas. Considerando que as bactérias têm necessariamente de chegar ao intestino do hospedeiro e colonizá-lo para poder exercer as suas funções terapêuticas, a sobrevivência das estirpes a estas condições torna-se importante e constitui um dos critérios para seleção de potenciais estirpes probióticas (Del Re *et al.*, 2000; Parvez *et al.*, 2006).

Assim, foram considerados neste ensaio três fatores, o efeito da lisozima, a influência do pH ácido em conjugação com a pepsina simulando o *stress* gástrico e a ação dos sais biliares e da pancreatina, simulando o *stress* intestinal.

Da observação da Tabela 4.1, podemos constatar que a lisozima não teve um efeito pronunciado na viabilidade das células bacterianas. Comparando o valor correspondente a G1 (contagem inicial) com o valor de G2 (após adição da lisozima) constata-se que todas as estirpes se apresentam com o mesmo ciclo logarítmico, não se verificando diferenças significativas de viabilidade.

Com a exposição a diferentes valores de pH (5,0; 4,1; e 3,0) e após incubação a 37 °C, durante 20 minutos, verificou-se uma pequena redução na viabilidade das estirpes. As estirpes B95 e 607 mostraram menor tolerância por redução de um ciclo logarítmico na sua viabilidade na primeira etapa de redução do valor de pH, fase G3 - pH 5,0. Contrariamente, as estirpes P e 69B apenas evidenciaram a perda de viabilidade na fase G5, correspondendo ao valor de pH de 3,0. As restantes perderam viabilidade também nesta etapa, no entanto a perda não foi significativa. Quando o *stress* gástrico simulado atingiu o valor de pH 2,1 e 1,8 (fase G6 e G7), todas as estirpes evidenciaram uma redução drástica. O controlo utilizado (LCS) mostrou ser o mais sensível às condições gástricas mais ácidas, perdendo viabilidade de 7 ciclos logarítmicos. De um modo geral, os resultados indicam que condições gástricas com pH inferior a 3,0

apresentam um efeito acentuado na redução da viabilidade celular. Tal como foi demonstrado por Zhou *et al.* (2007) valores de pH 2,0 e 1,8 são considerados como críticos para seleção de potenciais probióticos.

Para avaliar a tolerância às condições ambientais do duodeno, foram estudadas alíquotas recolhidas da fase G3, G4 e G5, adicionadas de sais biliares e pancreatina. Tem sido demonstrado que valores baixos de pH podem tornar as células mais suscetíveis à ação da bÍlis na fase intestinal (Callegari *et al.* 2006). Neste sentido, na fase Gi3 e Gi4, alíquotas que advém da fase G3 e G4 com pH de 5,0 e 4,1, a viabilidade celular mantém-se ou perde-se (máximo 1 - 2 ciclos logarÍtmicos). Já na fase Gi5, alíquotas com um pH 3,0 proveniente da fase gástrica G5, verificou-se uma perda de viabilidade celular maior (4 ciclos logarÍtmicos). As estirpes B96 e FF28 mostraram ser as menos tolerantes, com perda de 4 e 3 ciclos logarÍtmicos, respetivamente. De um modo geral, os resultados mostram que as estirpes 17.2b, K, 69B, 33, 614 e LCS, apresentaram uma elevada tolerância ao ambiente gástrico e intestinal.

Os resultados demonstram que as estirpes estudadas poderiam ser usadas como potenciais probióticas.

Tabela 4.1 Viabilidade (Log10 (UFC/ml)) das estirpes de *Lactobacillus* spp. após exposição a condições simuladas do estômago e intestino.

Estirpe	Viabilidade das estirpes de <i>Lactobacillus</i> spp em todas as etapas da digestão sequencial Log10 (UFC/ml)									
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	Gi3	Gi4	Gi5
17.2b	9,77 ± 0,14 a,A,B,C	9,83 ± 0,17 a,A,B	9,84 ± 0,10 a,A,B	9,88 ± 0,08 a,A,D	9,82 ± 0,09 a,A,C	6,29 ± 0,02 a,A,C	4,02 ± 0,17 b,A,C	9,67 ± 0,01 a,A	9,53 ± 0,06 a,A	9,12 ± 0,02 a,A
B13	9,63 ± 0,62 a,A,B,C	9,36 ± 0,56 a,A,B,C	9,35 ± 0,58 a,A,B,C,D,E	9,17 ± 0,78 a,A,B,C,D	9,09 ± 0,84 a,A,B	9,27 ± 0,01 a,A	6,55 ± 0,01 b,A	9,18 ± 0,07 a,B,D	9,10 ± 0,03 a,A,B	8,99 ± 0,03 a,A,C
K	9,64 ± 0,10 a,A,B,C	9,49 ± 0,10 a,A,B,C	9,53 ± 0,07 a,A,B,E	9,57 ± 0,11 a,A,D	9,61 ± 0,06 a,A,C	7,21 ± 0,00 b,A	3,82 ± 0,10 c,A,C	8,68 ± 0,03 d,C,F	9,43 ± 0,07 e,A,B	9,10 ± 0,10 e,A,C
B95	10,10 ± 0,10 a,A	9,83 ± 0,06 b,A,B	9,77 ± 0,12 b,A,B	9,69 ± 0,12 b,A,D	10,10 ± 0,01 a,A	7,44 ± 0,02 c,A	6,00 ± 0,00 d,A,C	8,81 ± 0,02 e,C,G	8,64 ± 0,06 e,B,D	8,80 ± 0,02 e,A,C
O1	9,93 ± 0,09 a,A,B	9,69 ± 0,08 a,e,A,B,C	9,69 ± 0,08 a,e,A,B,E	9,82 ± 0,11 a,A,D	9,61 ± 0,04 a,e,A,C	6,57 ± 0,22 b,A,C	5,56 ± 0,12 c,A,C	8,96 ± 0,08 d,C,D,G	8,92 ± 0,14 d,A,B,D	9,37 ± 0,03 e,A
69B	9,82 ± 0,11 a,A,B,C	9,63 ± 0,06 a,b,A,B,C	9,67 ± 0,09 a,b,A,B,E	9,60 ± 0,03 a,b,A,D	9,59 ± 0,02 b,A,C	6,83 ± 0,00 c,A,C	4,74 ± 0,01 d,A,C	9,02 ± 0,03 e,D,G	9,14 ± 0,00 e,A,B	9,24 ± 0,05 e,A
607	9,36 ± 0,06 a,B,C	9,45 ± 0,14 a,A,B,C	8,73 ± 0,07 b,C,D	8,33 ± 0,66 b,B,C	8,21 ± 0,02 b,B	6,15 ± 0,05 c,A,C	3,75 ± 0,39 d,A,B,C	6,87 ± 0,02 c,E	6,74 ± 0,00 c,C	6,24 ± 0,01 c,B
P	9,85 ± 0,08 a,b,A,B,C	9,88 ± 0,06 a,A,B	9,79 ± 0,09 a,b,A,B	9,63 ± 0,01 a,b,A,D	9,51 ± 0,05 b,A,C	5,78 ± 0,07 c,A,C	4,58 ± 0,15 d,A,C	8,38 ± 0,05 e,F	8,98 ± 0,00 f,A,B,D	8,61 ± 0,31 e,f,A,C
FF28	10,10 ± 0,14 a,A	10,00 ± 0,09 a,A	10,00 ± 0,10 a,A	9,98 ± 0,00 a,A	9,92 ± 0,03 a,A,C	7,46 ± 0,01 b,A	5,87 ± 0,08 c,A,C	8,42 ± 0,17 d,F	8,13 ± 0,02 d,D	5,73 ± 0,05 c,B
33	9,37 ± 0,02 a,B,C	9,34 ± 0,08 a,A,B,C	8,66 ± 0,68 a,b,D	8,10 ± 0,33 b,C	9,04 ± 0,02 a,b,A,B,C	5,99 ± 0,02 c,A,C	3,53 ± 0,08 d,A,B,C	9,34 ± 0,00 a,B,H	9,30 ± 0,04 a,A,B	9,05 ± 0,01 a,b,A,C
A1	10,10 ± 0,48 a,A	9,90 ± 0,81 a,A,B	9,49 ± 0,07 a,A,B,C,E	9,47 ± 0,07 a,A,B,D	9,50 ± 0,00 a,A,C	7,51 ± 0,02 b,A	0,00 ± 0,00 c,B	9,58 ± 0,04 a,A,H	9,50 ± 0,02 a,A	9,39 ± 0,03 a,A
614	9,22 ± 0,48 a,C,D	9,14 ± 0,47 a,B,C	9,10 ± 0,56 a,B,C,D,E	8,80 ± 0,72 a,B,C,D	8,79 ± 0,58 a,B,C	9,09 ± 0,01 a,A	5,81 ± 0,47 b,A,C	9,13 ± 0,01 a,B,D	9,11 ± 0,01 a,A,B	9,05 ± 0,02 a,A,C
B96	9,24 ± 0,14 a,C,D	9,43 ± 0,12 a,A,B,C	9,38 ± 0,07 a,A,B,C,D,E	9,48 ± 0,07 a,A,B,D	9,15 ± 0,00 a,A,B,C	0,00 ± 0,00 b,B,C	5,65 ± 0,06 c,A,C	6,81 ± 0,15 c,E	6,62 ± 0,03 c,C	6,49 ± 0,08 c,B
LCS	8,58 ± 0,14 a,D	8,85 ± 0,13 a,C	8,85 ± 0,13 a,C,D,E	8,94 ± 0,08 a,A,B,C,D	9,17 ± 0,42 a,A,B,C	1,89 ± 3,28 b,B	1,63 ± 2,83 c,B,C	8,79 ± 0,09 a,C,G	8,26 ± 0,57 a,D	8,23 ± 0,61 a,C

Os resultados são expressos em média ± desvio padrão de três ensaios independentes para cada estirpe (n = 3). Valores com letras minúsculas sobscritas iguais indicam que não existem diferenças estatísticas entre etapas da digestão, para cada estirpe, e letras maiúsculas sobscritas iguais indicam que não existem diferenças significativas entre estirpes, para cada etapa da digestão (P > 0,05).

4.1.2.2 Atividade antimicrobiana frente a bactérias patogénicas

A atividade antimicrobiana constitui uma das propriedades a ter em conta na seleção dos microrganismos probióticos. O papel protetor frente a microrganismos patogénicos do trato gastrointestinal bem como os mecanismos subjacentes tem recebido especial atenção, constituindo um critério para seleção de novos probióticos para uso humano (Soccol *et al.*, 2010).

Tabela 4.2 Atividade antimicrobiana das estirpes de *Lactobacillus* spp. frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

Espécies Bactérias patogénicas	Bactérias Lácticas													
	17.2b	B13	K	B95	O1	69B	607	P	FF28	33	A1	614	B96	LCS
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	+	+	++	+	+	+	++	+	+	+	+	+	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	++	++	+	++	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	++	+	++	++	-	+	++	++	++	++	++	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

(-) Ausência de halo de inibição; (+) halo de inibição de 1-3 mm; (++) halo de inibição superior a 3 mm.

A atividade antimicrobiana das estirpes de *Lactobacillus* spp. foi avaliada em placas de meio agar através da medição de halos de inibição (Material e métodos). Foram estudadas duas bactérias patogénicas Gram-negativas e duas Gram-positivas. Da observação da Tabela 4.2, verifica-se que o sobrenadante das estirpes, isento de células, exibiram halos de inibição de diferente dimensão, incluindo ausência total nalguns casos, em função do agente patogénico e das estirpes em estudo.

De um modo geral, as bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 8739 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028) mostraram ser as mais sensíveis, exibindo um halo de inibição com dimensão superior a 3 mm. As estirpes B96 e o controlo LCS não evidenciaram atividade antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Estes resultados concordam com os registados por Obadina *et al.* (2006) em estirpes de *L. plantarum* isoladas de processos de fermentação. Estas estirpes também mostraram inibição frente a *S. typhimurium* e *E. coli*.

Estes resultados sugerem que as estirpes de *Lactobacillus* spp. testadas podem ter um papel importante na redução da incidência deste tipo de bactérias patogénicas, atuando diretamente no alimento ou após a sua passagem no intestino.

4.1.2.3 Capacidade de auto-agregação e co-agregação

As bactérias probióticas devem exibir outras propriedades relacionadas com a sua maior ou menor capacidade de colonização da parede intestinal fundamentalmente para que os efeitos benéficos esperados se façam sentir (Tuomola *et al.*, 2001). A auto-agregação é a capacidade das bactérias agregarem entre si de uma forma não específica e é reconhecida como um pré-requisito para a sua colonização gastrointestinal (Del Re *et al.*, 2000). A co-agregação é a capacidade das bactérias agregarem a bactérias de espécies diferentes (Roos *et al.*, 1999). A capacidade para formar biofilmes, como mecanismo que protege o hospedeiro da colonização de patogênicos, reforça a importância terapêutica que estas bactérias podem ter no trato gastrointestinal (Dunne *et al.*, 2001; Todorov *et al.*, 2008).

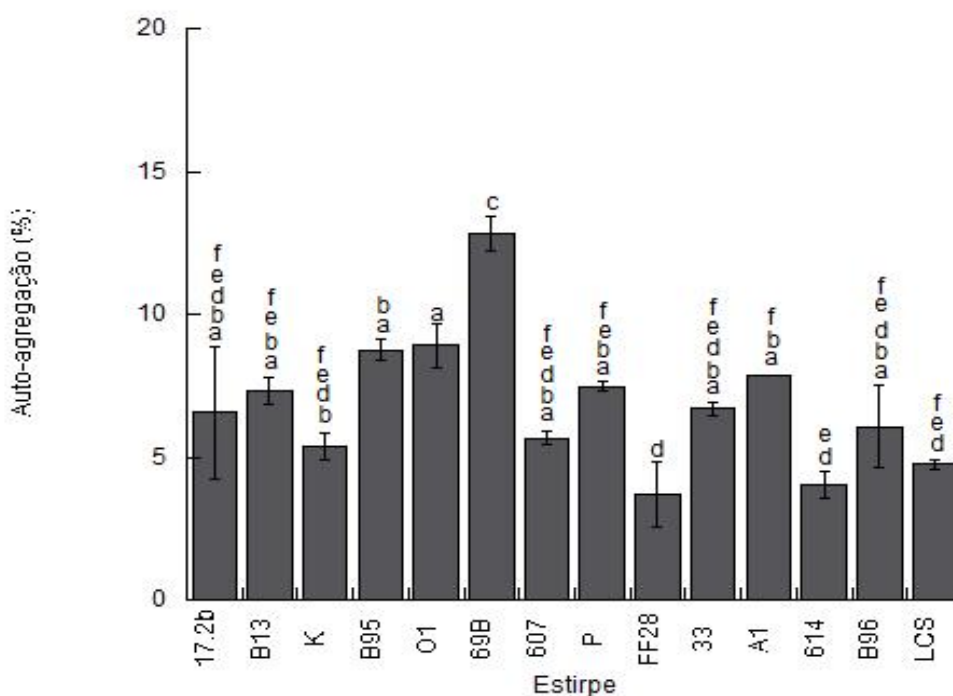


Figura 4.3 Capacidade de auto-agregação (%) das estirpes de *Lactobacillus* spp. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão de três ensaios independentes para cada estirpe (n = 3). Barras com letras sobscritas iguais, indica que não existe diferenças estatísticas entre as estirpes (P > 0,05).

Tabela 4.3 Capacidade de co-agregação (%) das estirpes de *Lactobacillus* spp com potenciais patogênicos intestinais.

Espécies		Co-agregação (%)			
Bactérias Lácticas	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	
17.2b	18,30 ± 0,99 ^{a,A}	43,00 ± 0,07 ^{b,A}	16,10 ± 1,74 ^{a,A,B,D}	16,30 ± 0,83 ^{a,A,B,D,E,F}	
B13	22,30 ± 0,04 ^{a,B}	41,00 ± 0,42 ^{b,B,E}	24,30 ± 4,62 ^{a,A,E}	19,10 ± 5,95 ^{a,A,B,E,F}	
K	18,90 ± 0,27 ^{a,A}	34,70 ± 0,36 ^{b,C}	13,10 ± 1,64 ^{c,B,D}	12,20 ± 0,76 ^{c,B,D,E,F}	
B95	37,20 ± 0,03 ^{a,C}	53,70 ± 0,18 ^{b,D}	42,10 ± 2,33 ^{a,c,C}	45,70 ± 2,98 ^{c,C}	
O1	16,30 ± 0,12 ^{a,D,E}	39,20 ± 0,91 ^{b,E,G}	13,70 ± 4,24 ^{a,B,D}	16,10 ± 2,85 ^{a,A,B,D,E,F}	
69B	15,70 ± 0,03 ^{a,b,E}	20,30 ± 0,16 ^{a,F}	11,50 ± 2,63 ^{b,c,D}	8,380 ± 0,13 ^{c,D}	
607	18,90 ± 0,82 ^{a,A}	40,70 ± 0,42 ^{b,B,E,G}	14,70 ± 0,05 ^{c,B,D}	13,20 ± 1,49 ^{c,B,D,E,F}	
P	15,90 ± 0,40 ^{a,D,E}	39,10 ± 0,46 ^{b,G}	10,40 ± 2,41 ^{a,c,D}	9,140 ± 1,24 ^{c,D,F}	
FF28	15,40 ± 0,48 ^{a,E}	31,00 ± 0,00 ^{b,H}	13,20 ± 1,06 ^{a,B,D}	14,20 ± 1,82 ^{a,B,D,E,F}	
33	14,90 ± 0,65 ^{a,E}	33,00 ± 1,08 ^{b,C}	26,60 ± 1,69 ^{b,c,E}	22,00 ± 3,25 ^{a,c,A,B}	
A1	22,10 ± 0,06 ^{a,B}	42,20 ± 0,00 ^{b,A,B}	26,60 ± 0,31 ^{c,E}	25,70 ± 1,87 ^{a,c,A}	
614	15,20 ± 0,42 ^{a,c,E}	33,90 ± 0,68 ^{b,C}	21,00 ± 1,06 ^{a,A,B,E}	10,60 ± 4,10 ^{c,D,E,F}	
B96	15,90 ± 0,14 ^{a,D,E}	40,60 ± 0,13 ^{b,B,E,G}	9,930 ± 0,35 ^{c,D}	20,40 ± 1,99 ^{d,A,B,E}	
LCS	17,70 ± 0,30 ^{a,A,D}	33,20 ± 0,27 ^{b,C}	12,80 ± 1,16 ^{c,B,D}	9,570 ± 0,91 ^{d,D,F}	

Média ± desvio padrão com letras minúsculas sobrescritas iguais indicam que não existem diferenças significativas entre as bactérias patogênicas, testadas para cada bactéria láctica e letras maiúsculas sobrescritas iguais indicam que não existem diferenças significativas entre as bactérias lácticas estudadas, para cada patogênica (P > 0,05).

Da observação da Figura 4.3, verifica-se que as estirpes testadas mostraram um comportamento variável apresentando diferentes percentagens de auto-agregação, ou seja, esta capacidade parece ser estirpe-dependente. Os valores variaram de 3,72 % a 12,8 %, sendo que a estirpe 69B foi aquela que mostrou uma maior capacidade para aderir a estirpes da mesma espécie com a consequente maior capacidade para colonizar. De um modo geral, os valores apresentados são considerados baixos quando comparados com os indicados como aceitáveis (> 40%) para estirpes probióticas, tal como referido por Del Re *et al.* (1998). No entanto, apesar dos valores baixos apresentados - com exceção das estirpes FF28 e 614, todas mostraram ter uma capacidade de auto-agregação superior ao controlo (LCS) (4,75%). Os resultados diferem dos reportados por Todorov *et al.* (2008) para outros *Lactobacillus*, espécies *plantarum*, *paracasei*, *rhamnosus* e *pentosus*, cujas percentagens de auto-agregação variaram de 67 a 99% sendo espécie-dependente. As percentagens de auto-agregação registadas nas estirpes de *Lactobacillus* spp. em estudo, poderão estar relacionadas com componentes específicos da superfície celular, dependendo estes da origem da estirpe (Klayraung *et al.*, 2008).

Da observação da Tabela 4.3, verifica-se que todas as estirpes apresentaram capacidade de co-agregar com as quatro bactérias patogênicas testadas. Os valores obtidos variaram de 8,38% a 45,7%, o que sugere que esta capacidade depende das características da bactéria, tal como foi previamente sugerido por Collado *et al.* (2008). A estirpe B95 demonstrou melhor capacidade de

co-agregação com todas as patogênicas ($\geq 37\%$). De um modo geral, *Staphylococcus aureus* apresenta um elevado nível de co-agregação com todas as bactérias lácticas estudadas (20-53%). Níveis mais baixos foram observados em *Listeria monocytogens* (8-45%). *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* apresentaram um comportamento semelhante.

Em resumo, estes resultados sugerem que existe uma grande variabilidade entre as estirpes de *Lactobacillus* spp. pressupondo também variabilidade na capacidade de aderência às células intestinais.

4.1.2.4 Aderência a células Caco-2

A capacidade das bactérias para aderir ao epitélio intestinal é importante na colonização do trato gastrointestinal. A maior ou menor capacidade de aderência condiciona a sua expulsão pelos movimentos peristálticos dificultando-a mais ou menos e podendo constituir, assim, uma vantagem competitiva no ecossistema (Del Re *et al.*, 2000).

Embora tenham sido observados diferentes níveis de aderência, todas as estirpes estudadas mostraram ter capacidade para aderir à linha celular Caco-2 (Figura 4.4). A capacidade de aderência variou de 0,83% e 15,2 %, sendo que a estirpes 33, 607 e 17.2b mostraram melhor capacidade para aderir (15,2; 9,80; e 12,9 %, respetivamente). Valores mais baixos foram registados nas estirpes A1, K, O1, B96 e 614 (3,59; 3,51; 3,49, 3,42; e 0,83%, respetivamente), e no controlo (LCS) com 4,05%.

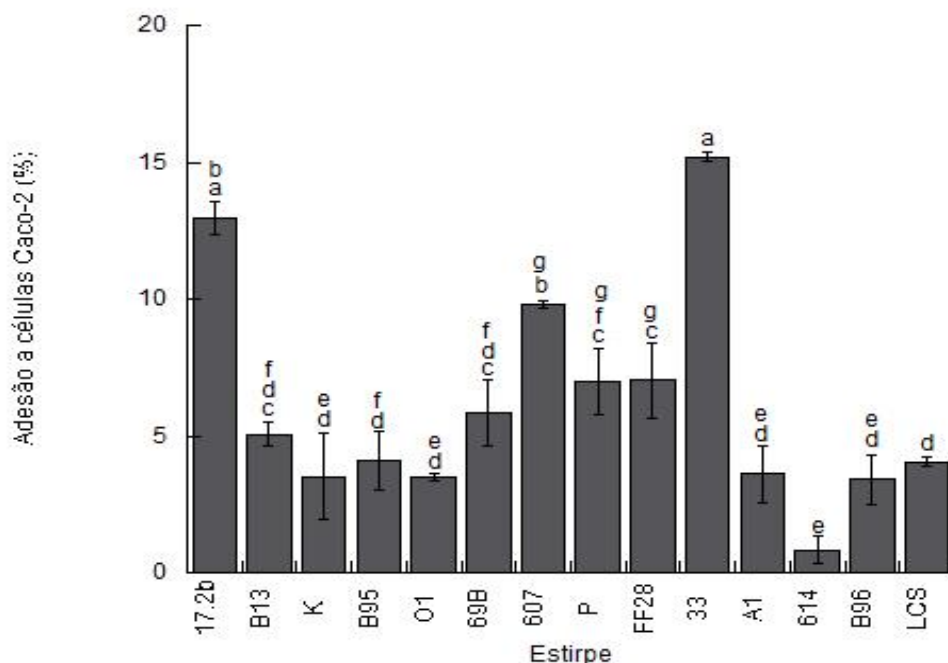


Figura 4.4 Capacidade de adesão a células Caco-2 (%) das estirpes de *Lactobacillus* spp. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão de três ensaios independentes para cada estirpe (n = 3). Barras com letras sobscritas iguais, indica que não existem diferenças significativas entre as estirpes (P > 0,05).

Vários estudos, envolvendo diferentes estirpes de *Lactobacillus* e células Caco-2, apresentaram sempre níveis de aderência ligeiramente baixos. Letho e Salminen (1997) mostraram níveis de aderência a células Caco-2 de 10-12% em *Lactobacillus* GG e *Lactobacillus rhamnosus* LC-705, semelhantes aos encontrados neste estudo. Paralelamente, o estudo efetuado por Tuomola e Salminen (1998) em 12 estirpes diferentes de *Lactobacillus* com uma linha celular Caco-2 mostrou que as quatro estirpes [*L. casei* (Fyos[®]), *L. acidophilus* 1 (LC1[®]), *L. rhamnosus* LC-705 e *Lactobacillus* GG (ATCC 53103)] evidenciaram uma maior capacidade de aderência, variando esta de 9-14%.

A maioria dos modelos utilizados por diferentes autores para avaliar a capacidade de aderência das estirpes *in vitro* pretende representar condições mais simplificadas dos modelos *in vivo*. No entanto, deve ter-se especial atenção aquando da extrapolação de resultados obtidos recorrendo a um ou outro modelo, uma vez que a aderência e colonização por probióticos devem ser determinadas em modelos *in vivo*. Têm sido desenvolvidos ensaios em animais com o objetivo de ser estabelecida a correlação entre os modelos *in vivo* e *in vitro*. A aderência *in vitro* de bactérias probióticas não é evidente em humanos dados os resultados da sua persistência em fezes (Zárate *et al.*, 2002). Em relação a este aspeto, a caracterização bioquímica da superfície bacteriana envolvida na capacidade de aderência da estirpe é fundamental.

4.2 Microencapsulação de bactérias lácticas

A temperatura constitui um importante fator na sobrevivência das bactérias encapsuladas durante o período de armazenamento. De modo a elucidar este efeito foram selecionadas, após a realização dos ensaios anteriores, as duas estirpes 33 e 17.2b (*L. plantarum*) que mostraram ter um melhor potencial probiótico. Partindo de uma mesma concentração de inóculo inicial, 10⁹ UFC/g, foram estudadas duas temperaturas de armazenamento, 4 °C e 22 °C, durante 30 dias. Paralelamente, para cada estirpe, foi realizado um ensaio em branco (designado por ensaio controlo - NP). Este ensaio decorreu nas mesmas condições que o anterior, diferenciando-se apenas na fase final, em que não foi adicionado o cloreto de cálcio que confere a estrutura final das cápsulas.

À temperatura de 4 °C, após os 30 dias de armazenamento (Figura 4.5), a sobrevivência das estirpes manteve-se ou apenas reduziu 1 a 2 ciclos logarítmicos. A maior perda verificou-se na estirpe LCS NP (10⁶ UFC/g), tendo-se verificado um decréscimo mais acentuado a partir dos 12 dias de armazenamento. No final do período de armazenamento, as estirpes 33 (10⁹ UFC/g) e LCS (10⁸ UFC/g) comparadas com o respetivo controlo - NP, 33 NP (10⁸ UFC/g) e LCS NP (10⁶ UFC/g), mostraram diferenças significativas na viabilidade celular das mesmas (P < 0,05). Após

os 30 dias de armazenamento, as estirpes 17.2b (10^8 UFC/g) e 17.2b NP (10^8 UFC/g) não mostraram diferenças significativas na viabilidade celular ($P > 0,05$).

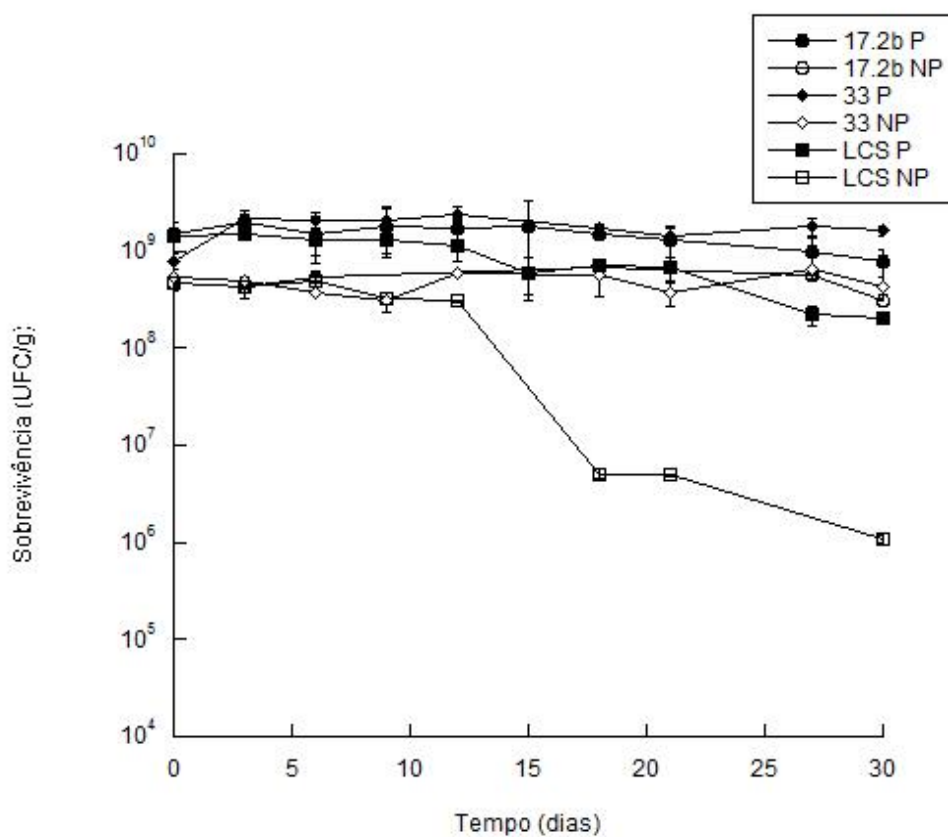


Figura 4.5 Sobrevivência das estirpes durante o período de armazenamento à temperatura de 4 °C, após microencapsulação pelo método de extrusão. P- células protegidas/encapsuladas; NP- células não protegidas/ células livres Os dados são expressos em média \pm desvio padrão de três ensaios independentes, para cada estirpe ($n = 3$).

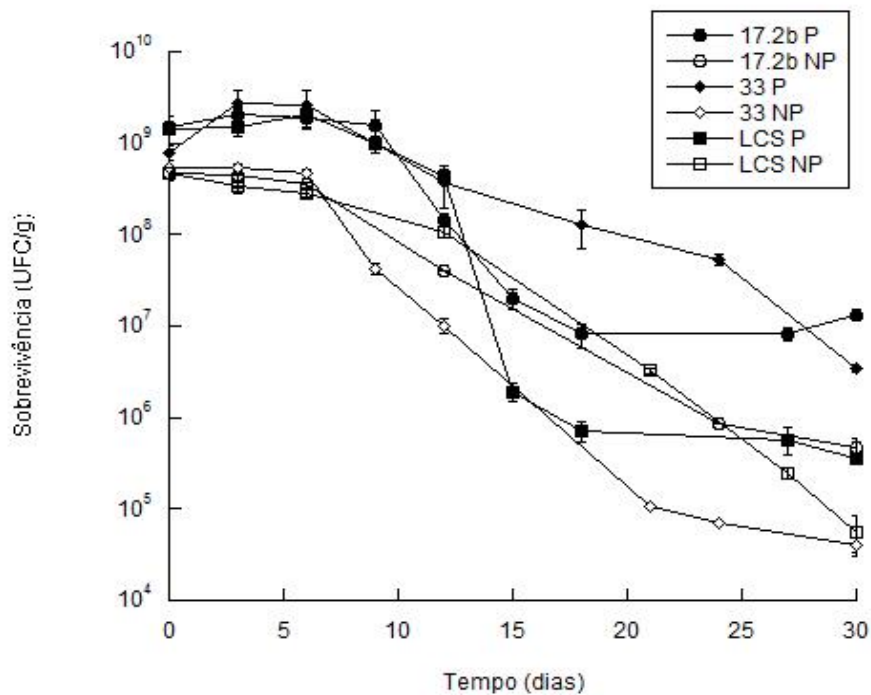


Figura 4.6 Sobrevivência das estirpes durante o período de armazenamento à temperatura de 22 °C, após microencapsulação pelo método de extrusão. P- células protegidas/encapsuladas; NP- células não protegidas/células livres. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão de três ensaios independentes, para cada estirpe (n = 3).

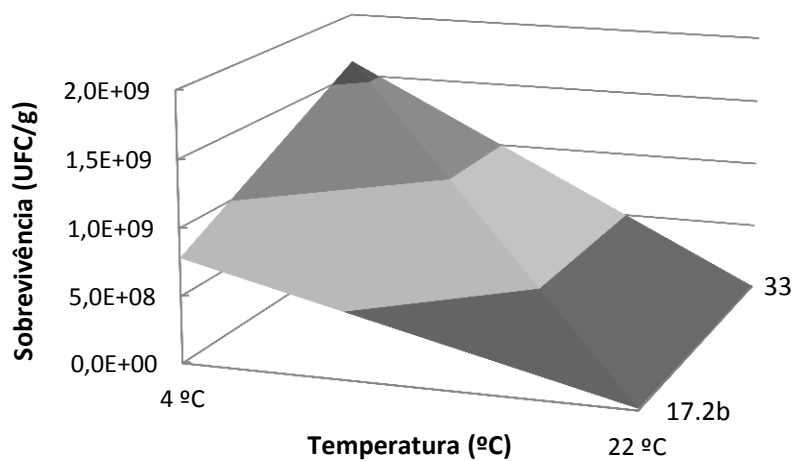


Figura 4.7 Seleção da estirpe e temperatura, após 30 dias de armazenamento das bactérias encapsuladas pelo método de extrusão a 4 °C e 22 °C.

À temperatura de 22 ° C (Figura 4.6) verificou-se que, após 6 dias de armazenamento, a viabilidade celular decresceu, tanto das estirpes encapsuladas (P) como no controlo. Esta perda celular é constante até ao final do período de armazenamento, perdendo 2 a 5 ciclos logarítmicos na estirpe 17.2b e 17.2b NP, respetivamente. Após os 30 dias, as estirpes 33 (10^6 UFC/g) e 17.2b (10^7 UFC/g) quando comparadas com o correspondente controlo - NP (33 NP - 10^4 UFC/g e 17.2b NP - 10^5 UFC/g) apresentaram diferenças significativas na viabilidade celular ($P < 0,05$). O mesmo comportamento não se verificou nas estirpes LCS e LCS NP, que reduziram, nas duas situações, o correspondente a 4 ciclos logarítmicos.

Segundo Mortazavian *et al.* (2007), a mistura de alginato com amido de milho dá origem a cápsulas que proporcionam uma melhor proteção às células conferindo-lhes uma elevada viabilidade celular. Isto deve-se à estrutura, bem como ao efeito prebiótico do composto de amido de milho.

Assim, dos resultados do controlo feito a cada estirpe, em ambos as condições (temperaturas de 4 e 22 °C), poderá inferir-se que a formação das cápsulas com a solução de cloreto de cálcio desempenhou um papel importante na proteção das células. Segundo Capela *et al.* (2007), quando o alginato de sódio é combinado com cloreto de cálcio forma-se uma matriz de gel, revestida por uma capa exterior, que protege os organismos probióticos mais sensíveis.

Estes resultados concordam com os demonstrados previamente por Teixeira *et al.* (1995), Champagne *et al.* (1996), Eun *et al.* (2007) e Mortazavian *et al.* (2008) nos quais as temperaturas baixas promovem um efeito benéfico na manutenção das bactérias lácticas encapsuladas quando comparado com a temperatura de 22 °C.

Da observação da Figura 4.7, verificou-se que, após os 30 dias de armazenamento à temperatura de 4 °C, a estirpe 33 P apresentou maior viabilidade celular ($1,6 \times 10^9$ UFC/g) quando comparada com a estirpe 17.2b também encapsulada/protegida (P) ($7,8 \times 10^8$ UFC/g). Tendo em conta a concentração do inóculo inicial (10^9 UFC/g), verificou-se que a estirpe 33 nas condições de armazenamento estudadas é a única estirpe que consegue manter-se no mesmo ciclo logarítmico. Assim, considerando que os alimentos com propriedades funcionais devem conter estirpes probióticas numa concentração de 10^6 - 10^7 UFC/ml no final do período de vida útil (Saarela *et al.*, 2000; Guimarães *et al.*, 2013), optou-se por selecionar a estirpe 33 e a temperatura de 4 °C para posterior aplicação e armazenamento em pasta de azeitona incorporada com probióticos. Os resultados mostraram, tal como sugerido por Guimarães *et al.* (2013), que as cápsulas armazenadas sob refrigeração, durante 30 dias, poderão ser ingeridas mantendo estas uma viabilidade adequada. Para que os efeitos benéficos na saúde do hospedeiro se verifiquem,

seria recomendada a ingestão de aproximadamente 1g de cápsulas, o que equivale a 100 g de um iogurte probiótico (Charalampopoulos *et al.*, 2002).

4.3 Caracterização física das cápsulas

O tamanho das cápsulas é um parâmetro importante a considerar quando da sua aplicação em produtos alimentares, uma vez que a textura destes pode ser afetada. Estas devem ser suficientemente pequenas para evitar o impato negativo nas propriedades sensoriais do produto alimentar (Heidebach *et al.*, 2012). Tem sido sugerido que cápsulas com um diâmetro superior a determinado limite ($> 100 \mu\text{m}$, particularmente superior a 1 mm) afetam a aparência e a granulidade de produtos láteos, como leite e iogurte (Mortazavian *et al.*, 2007).



Figura 4.8 Cápsulas preparadas com alginato de sódio e amido.



Figura 4.9 Morfologia externa das cápsulas preparadas com alginato de sódio e amido.

As cápsulas formadas a partir de amido de milho e alginato de sódio, utilizadas neste estudo, evidenciaram uma forma esférica e uniforme com um raio de aproximadamente 208 ± 37 μm (Figura 4.8 e 4.9). Ainsley-Reid *et al.* (2005) explica a vantagem do uso de cápsulas esféricas preparadas pelo método de extrusão, quando em contato com o Ca^{2+} . A superfície lisa e compacta confere maior resistência a diferentes condições ambientais, garantindo, ao mesmo tempo, a conservação das células no seu interior. Vidhyalakshmi *et al.* (2009) considera ainda que o método anterior é excelente para a formação de cápsulas com diâmetro compreendido entre 400 - 2000 μm . Outros estudos demonstraram que a aplicação do método de extrusão em microencapsulação, usando 2% de alginato de sódio, origina cápsulas com um tamanho de 1,62 mm (Rokka e Rantamaki, 2010). Sabe-se ainda que o tamanho das cápsulas depende da viscosidade da mistura células- hidrocolóide, do diâmetro do orifício por onde é expulsa a mesma, bem como da distância entre a sua saída e a solução de endurecimento (Heidebach *et al.*, 2012).

4.4 Efeito do tratamento térmico

A microencapsulação tem como objetivo proteger as células em ambientes adversos. O tratamento térmico aplicado durante o processamento de alimentos pode provocar a morte ou lesão celular; daí, ser pertinente o desenvolvimento de microcápsulas estáveis ao calor. Por outro lado, o desenvolvimento de microcápsulas termicamente estáveis pode também ser útil aquando do aquecimento de produtos alimentares com características funcionais, tais como bolos e salsichas (Ding e Shah, 2007).

O objetivo deste ensaio consiste na avaliação da sobrevivência da estirpe 33 encapsulada, após exposição a temperaturas elevadas. Assim, as células na forma livre (controlo do ensaio) e as células encapsuladas foram sujeitas a três temperaturas diferentes (72, 85 e 90 °C), durante 30 segundos.

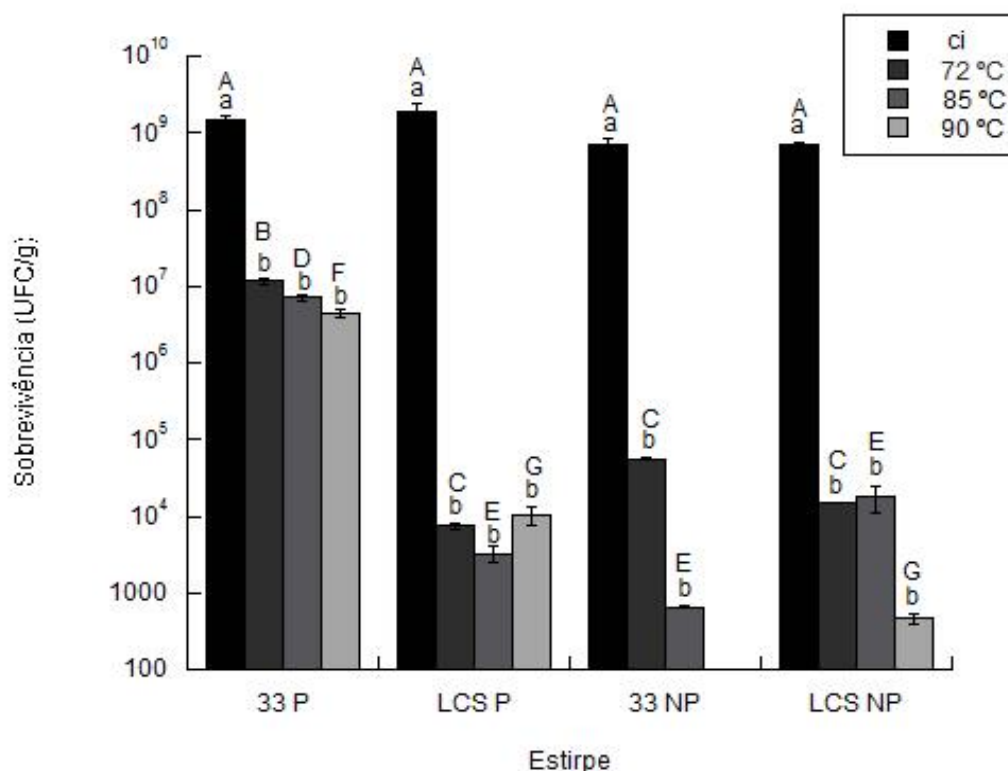


Figura 4.10 Viabilidade das células livres e encapsuladas após diferentes tratamentos térmicos. P- células protegidas/encapsuladas; NP- células não protegidas/ células livres; ci- contagem inicial. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão de três ensaios independentes para cada estirpe (n = 3). Barras com letras minúsculas sobscritas iguais, indica que não existe diferenças significativas entre a contagem inicial e os diferentes tratamentos térmicos para cada estirpe, enquanto as letras maiúsculas sobscritas iguais indica que não há diferenças significativas entre estirpes para cada tratamento ($P > 0,05$).

Da observação da Figura 4.10, verifica-se que a estirpe 33 na forma livre evidenciou maior sensibilidade ao choque térmico, reduzindo 4 e 6 ciclos logarítmicos, quando submetida a temperatura de 72 °C e 85 °C, respectivamente. Quando exposta à temperatura de 90 °C não foi registrada viabilidade celular o que leva a assumir que esta temperatura é letal para esta estirpe. Estes resultados concordam com os demonstrados por Sabikhi *et al.* (2010), onde *L. acidophilus* LA1 na forma livre, quando exposto a temperaturas elevadas mostrou perda de viabilidade, não se registrando crescimento, à temperatura de 90 °C. A estirpe 33 na forma encapsulada mostrou maior resistência ao *stress* térmico, reduzindo a viabilidade em 2 e 3 ciclos logarítmicos.

Face à concentração do inóculo inicial, as duas estirpes (33 e LCS), em cada condição (livre e encapsulada) e em cada temperatura (72, 85 e 90 °C), foram registradas diferenças significativas na viabilidade celular ($P < 0,05$). No entanto, comparando as três temperaturas entre si, independentemente da estirpe e da condição, não foram registradas diferenças significativas na viabilidade celular ($P > 0,05$).

Comparando a estirpe 33 nas formas livre e encapsulada, para cada temperatura, registaram-se diferenças significativas na viabilidade celular ($P < 0,05$). Tendo em conta a maior capacidade de sobrevivência da estirpe 33 encapsulada, poderá inferir-se que o encapsulamento é essencial para esta estirpe. A maior resistência poderá ser explicada pela proteção adicional do amido de milho, tal como descrito por Mandal *et al.* (2006). Estes resultados concordam com os demonstrados por Kim *et al.* (2008) nos quais foi comprovada uma menor perda de viabilidade celular da estirpe *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 encapsulada, quando comparada com a não encapsulada a temperatura elevada. Por outro lado, a estirpe 33 nas temperaturas mais elevadas de 85 e 90 °C manteve os teores de células 10^6 UFC/ml, valor indicado como mínimo da concentração de probióticos em alimentos funcionais (Doleyres e Lacroix, 2005). A estirpe LCS (controlo) revelou um comportamento diferente, não mostrando resistência às três temperaturas quer na forma livre, quer na forma encapsulada.

4.5 Produção da pasta de azeitona

Este trabalho teve como objetivo estudar a sobrevivência da estirpe *L. plantarum* 33 incorporada na pasta de azeitona durante 30 dias de armazenamento, à temperatura de 4 °C. Em paralelo decorreu um ensaio no qual foi usada a estirpe controlo (LCS).



Figura 4.11 Pasta de azeitona.

Partindo de um inóculo inicial de 10^9 UFC/g, foram adicionados 10 % (w/w) de cada estirpe nas formas encapsulada e livre à pasta de azeitona previamente preparada (Figura 4.11).

As amostras retiradas da pasta de azeitona, antes da adição das estirpes, não evidenciaram crescimento após plaqueamento em MRS agar, LBS e PCA, o que sugere que o tratamento térmico efetuado quando da preparação da pasta foi eficaz para a sua estabilização biológica.

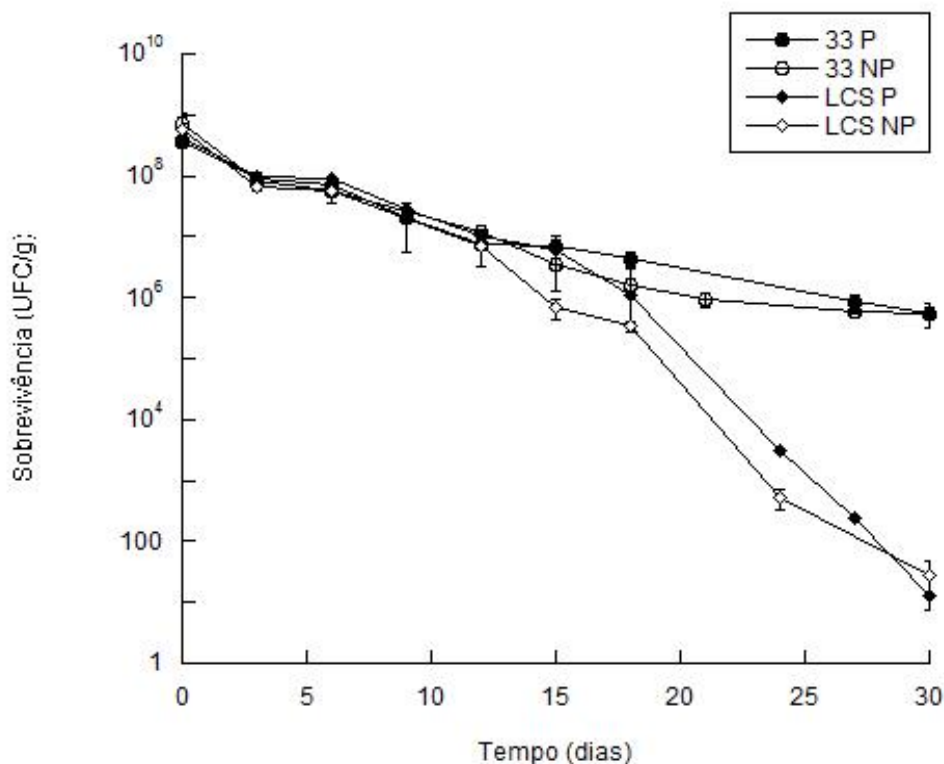


Figura 4.12 Viabilidade celular da estirpe 33 nas formas encapsulada e livre incorporada na pasta de azeitona durante 30 dias de armazenamento. P- células protegidas/encapsuladas; NP- células não protegidas/células livres. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão de três ensaios independentes para cada pasta (n = 3).

Da análise da Figura 4.12 verifica-se que, ao longo do armazenamento, a viabilidade das estirpes nas formas livre e encapsulada decresceu progressivamente até aos 30 dias. Durante os primeiros 13 dias, as estirpes apresentaram um comportamento semelhante; a partir desta data e até ao final do período de armazenamento (30 dias), a redução tornou-se mais acentuada e foi mais evidente no controlo (LCS), pelo que a estirpe 33 (livre e encapsulada) evidenciou maior resistência. Aos 30 dias de armazenamento não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) na viabilidade celular das estirpes, nas duas formas de apresentação. Apesar de tratar-se de uma matriz diferente, num estudo feito por Homayouni *et al.* (2008) em gelado conservado a -20 °C durante 180 dias, ficou demonstrado que as estirpes *Lactobacillus casei* (Lc-01) e

Bifidobacterium lactis (Bb-12) adicionadas nas formas livre e encapsulada não apresentaram diferenças de viabilidade, após os 30 dias de armazenamento. Os resultados deste trabalho concordam, assim, com os registados por aqueles autores; neste estudo foi utilizado o mesmo material (alginato e amido) no processo de encapsulamento das bactérias. Face à concentração do inóculo inicial, foi observada uma perda de 2 ciclos logarítmicos na estirpe 33 (livre e encapsulada) e 7 na estirpe LCS (livre e encapsulada) até ao final do tempo de armazenamento.

A pasta de azeitona incorporada com a estirpe 33 nas formas livre e encapsulada, apresentou a concentração final de 10^6 UFC/g, limite para ser considerado um alimento funcional. O mesmo não se verificou na pasta contendo a estirpe LCS nas duas formas, cuja viabilidade celular foi de 10^1 UFC/g, o que sugere que esta estirpe é afetada pelo tipo de matriz.

Comparando a viabilidade celular das estirpes 33 e LCS encapsuladas quando incorporadas na pasta de azeitona e a viabilidade das mesmas observadas na ausência da matriz à mesma temperatura de 4 °C (ponto 4.2, capítulo 4.), verificou-se que a estirpe 33, quando em contato com a pasta, perde 2 ciclos logarítmicos e na sua ausência mantém a viabilidade celular de 10^9 UFC/g. A estirpe LCS, quando incorporada na pasta, perde 7 ciclos logarítmicos e na sua ausência apenas perde 1. A estirpe 33 mostrou ser mais resistente que o controlo (LCS), o que poderá indicar ser uma estirpe com elevado potencial probiótico.

Está ainda descrito que cápsulas produzidas com alginato apresentam algumas desvantagens, tais como porosidade e suscetibilidade a ambientes ácidos. A rápida difusão da humidade e outros fluidos das cápsulas alteram as suas propriedades afetando a função de barreira. Sabe-se ainda que os iões monovalentes ou quelantes absorvem os iões cálcio (como fosfatos, lactatos e citratos) quando em contato com estes, fazendo com que as cápsulas de alginato formadas na presença de iões cálcio percam a sua integridade (Mortazavian *et al.*, 2007).

As características do pH e da acidez da pasta de azeitona (ponto 5.1.1) associadas às propriedades antimicrobianas dos ingredientes usados (vinagre e alho) e o tipo de material encapsulante usado poderão explicar as diferenças de viabilidade das estirpes nas formas livre e encapsulada, após os 30 dias de armazenamento (Arora e Kaur, 1999).

4.5.1 Caracterização da pasta de azeitona

4.5.1.1 Determinação do pH e da acidez

Os parâmetros pH e acidez foram analisados em amostras de pasta de azeitona incorporadas com as estirpes, livres e encapsuladas, antes e após o período de armazenamento, por forma a perceber-se eventuais alterações ao longo do tempo.

Tabela 4.4 Valores de pH e acidez (expressa em % de ácido láctico) determinados na pasta de azeitona.

Tempo (dias)	Estirpe	pH	Acidez (%)
0	-	3,57 ± 0,01 ^a	0,74 ± 0,03 ^a
30	33 NP	3,50 ± 0,05 ^{a,b}	0,64 ± 0,03 ^b
	33 P	3,49 ± 0,03 ^{b,c}	0,68 ± 0,01 ^{a,b}
	LCS NP	3,46 ± 0,00 ^{b,c}	0,69 ± 0,01 ^{a,b}
	LCS P	3,42 ± 0,00 ^c	0,69 ± 0,02 ^{a,b}

Os resultados são expressos em média do pH e acidez ± desvio padrão de três ensaios independentes para cada estirpe. A acidez é expressa em % de ácido láctico. P corresponde às células protegidas/células encapsuladas e NP às células não protegidas/células livres. Letras sobrescritas iguais indicam que não existem diferenças significativas entre as estirpes estudadas, em cada parâmetro (pH e acidez) ($P > 0,05$).

Da observação da Tabela 4.4 verificou-se que o valor de pH, aos 30 dias, variou de 3,42 a 3,50 unidades. Tendo em conta o pH inicial da pasta, 3,57, registaram-se diferenças significativas entre os 0 e 30 dias nas pastas inoculadas com a estirpe 33 encapsulada e LCS (livre e encapsulada) ($P < 0,05$). A pasta contendo a estirpe 33 livre não registou diferenças significativas no valor de pH (3,50) face ao valor inicial ($P > 0,05$). Alvarenga *et al.* (2012) registou valores de pH semelhantes em pastas de azeitona tipo verde, oscilando os valores entre 3,24 e 3,76 unidades.

Em relação à acidez, aos 30 dias e à temperatura de 4 °C, registaram-se valores de 0,64 a 0,69% de ácido láctico. Face ao valor inicial (0,74 %) e ao contrário do pH, foram registadas diferenças significativas em termos de acidez na pasta incorporada com a estirpe 33 na forma livre (0,64%) ($P < 0,05$). Por outro lado, aos 30 dias, não foram registadas diferenças significativas em termos de acidez das pastas incorporadas com as estirpes nas formas livre e encapsulada ($P > 0,05$).

De um modo geral, durante o armazenamento, os valores de pH e acidez da pasta de azeitona não sofreram alteração, indicando que as estirpes quando incorporadas na forma livre mantiveram uma atividade metabólica muito reduzida ou mesmo nula.

4.5.1.2 Determinação dos parâmetros de cor

A cor constitui um parâmetro de qualidade dos alimentos utilizado pelo consumidor como indicador para aceitação ou rejeição de um produto (Afshari-Jouybarri e Farahnak, 2011). De acordo com a Comissão Internacional de Iluminação (CIE), a cor é medida pelas coordenadas L^* a^* b^* , em que: L^* varia de 0 (preto) a 100 (branco), o valor a^* positivo corresponde à cor vermelha e o negativo à cor verde, o valor de b^* positivo representa a cor amarela, enquanto o negativo representa a cor azul (Girolami *et al.*, 2013).



Figura 4.13 Determinação da cor na pasta de azeitona.

Tabela 4.5 Parâmetros de cor determinados na pasta de azeitona.

Tempo (dias)	Estirpe	L^*	a^*	b^*	ΔE
0	-	$84,60 \pm 1,66^a$	$9,66 \pm 1,15^a$	$57,8 \pm 0,23^a$	-
30	33 P	$78,60 \pm 0,70^{a,d}$	$11,00 \pm 1,25^{a,c}$	$61,90 \pm 7,18^{a,c}$	$8,750 \pm 3,62^a$
	33 NP	$69,00 \pm 1,29^{b,c}$	$17,40 \pm 1,06^b$	$78,30 \pm 2,35^b$	$26,90 \pm 0,73^b$
	LCS P	$61,30 \pm 4,00^c$	$12,00 \pm 2,94^{a,c}$	$63,60 \pm 4,00^{a,c}$	$21,60 \pm 1,46^b$
	LCS NP	$70,50 \pm 2,00^{b,d}$	$14,50 \pm 0,23^{b,c}$	$74,50 \pm 0,35^{b,c}$	$22,40 \pm 1,04^b$

Os resultados são expressos em média de cada parâmetro \pm desvio padrão de três ensaios independentes para cada estirpe. P corresponde às células protegidas/encapsuladas e NP às células não protegidas/células livres. Letras sobrescritas iguais indicam que não existe diferenças significativas entre as estirpes estudadas em cada coluna ($P > 0,05$).

Para determinar a diferença total de cor das pastas inoculadas (Figura 4.13) comparativamente com a pasta inicial (tempo 0 dias), foi calculado o valor de ΔE .

Os resultados (Tabela 4.5) mostram que o valor de L^* reduziu ao longo do período de armazenamento. Este decréscimo, verificado em todas as pastas com incorporação de células,

sugere que após os 30 dias de armazenamento a 4°C, a pasta de azeitona apresenta uma cor mais escura. Face à pasta inicial, tempo 0 para o valor de L* (84,6), não foram registadas diferenças significativas na pasta incorporada com estirpe 33 na forma encapsulada ($P > 0,05$). Ao contrário, os valores de a* e b* aumentaram em todas as condições, o que nos indica que a pasta, com o tempo, desenvolveu uma cor mais vermelha - amarelada. Não foram registadas diferenças significativas para os dois parâmetros (a* e b*) entre a pasta inicial e as pastas incorporadas com estirpes encapsuladas ($P > 0,05$). Estes resultados sugerem que as estirpes na forma encapsulada foram mais eficazes que as estirpes incorporadas na forma livre, relativamente à preservação dos parâmetros de cor da pasta de azeitona, o que poderá ser explicado pelos resultados encontrados para o pH e acidez.

Da avaliação do valor de ΔE , verificou-se que a diferença total de cor foi superior em pastas incorporadas com células livres, 26,90 e 22,40. A pasta contendo a estirpe 33 encapsulada apresentou a menor diferença total de cor, 8,75, parecendo ser a mais estável. As restantes modalidades não apresentaram diferenças significativas neste parâmetro ($P > 0,05$).

4.5.2 Avaliação sensorial da pasta de azeitona

Este estudo teve como objetivo avaliar sensorialmente a pasta de azeitona, nas diferentes modalidades, tentar perceber se existe influência da incorporação das cápsulas em termos sensoriais, bem como a correspondente intenção de compra.

Tabela 4. 6 Avaliação sensorial da pasta de azeitona ‘probiótica’.

Parâmetros	Estirpe <i>Lactobacillus</i>			
	33 P	33 NP	LCS P	LCS NP
Aparência	7,00 ± 0,06 ^a	6,80 ± 0,33 ^a	7,20 ± 0,24 ^a	7,00 ± 0,16 ^a
Cor	6,80 ± 0,16 ^a	6,80 ± 0,12 ^a	6,80 ± 0,18 ^a	6,90 ± 0,16 ^a
Sabor	5,40 ± 0,23 ^a	5,40 ± 0,38 ^a	5,70 ± 0,27 ^a	5,60 ± 0,06 ^a
Textura	6,50 ± 0,27 ^a	6,50 ± 0,27 ^a	6,50 ± 0,24 ^a	6,50 ± 0,29 ^a
Granulosidade	6,60 ± 0,11 ^a	6,20 ± 0,39 ^a	6,60 ± 0,10 ^a	6,40 ± 0,06 ^a
Cheiro	6,30 ± 0,57 ^a	6,10 ± 0,99 ^a	6,30 ± 0,48 ^a	6,30 ± 0,57 ^a
Apreciação geral	5,70 ± 0,19 ^a	5,80 ± 0,51 ^a	5,80 ± 0,32 ^a	6,20 ± 0,16 ^a
Intenção de compra	5,20 ± 0,23 ^a	5,30 ± 0,11 ^a	5,50 ± 0,39 ^a	5,70 ± 0,40 ^a

Os resultados são expressos em média ± desvio padrão de três provas independentes realizadas a cada pasta de azeitona (n = 3). Letras sobscritas iguais, indica que não existe diferenças significativas entre as estirpes, para cada parâmetro ($P > 0,05$). P- corresponde à pasta contendo a estirpe protegida/encapsulada; NP- corresponde à pasta contendo a estirpe não protegida/livre.

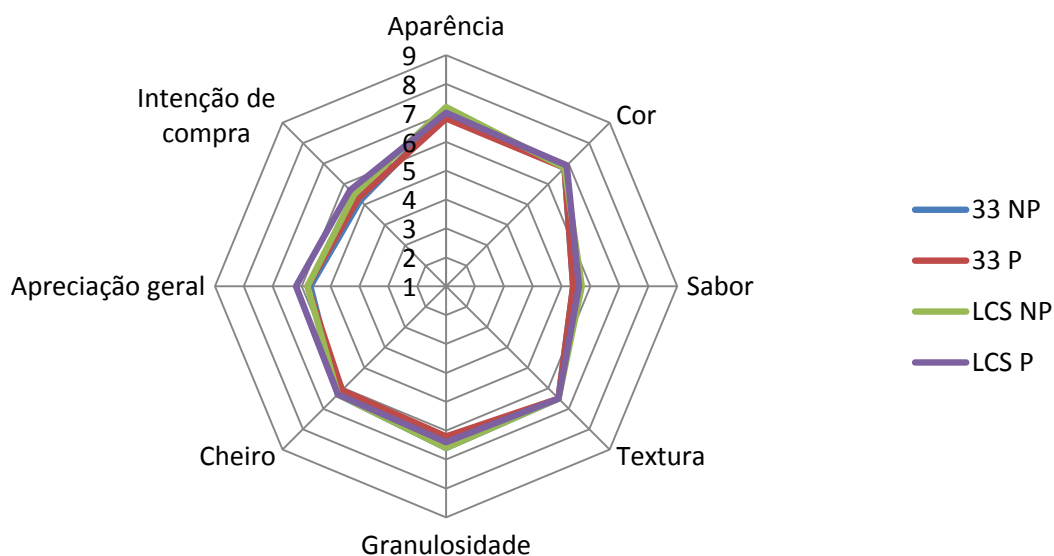


Figura 4.14 Parâmetros sensoriais da pasta de azeitona contendo bactérias encapsuladas (P) e não encapsuladas (NP), após 30 dias de armazenamento.

A avaliação sensorial da pasta de azeitona decorreu após os 30 dias de armazenamento. Da observação da Tabela 4.6 e Figura 4.14, verifica-se que numa escala hedónica de 9 pontos, foram atribuídos pontuações que variaram de 5,20 a 7,20, o que nos leva a deduzir que, de um modo geral, a pasta de azeitona foi bem aceite por este grupo de provadores. Tendo em conta a mesma classificação (6 pontos) em termos de granulosidade e textura nas quatro modalidades, pode ainda inferir-se que as cápsulas não foram detetadas pelos provadores. Estes resultados contrariam os apresentados por Kailasapathy (2006), onde foram encontradas diferenças em termos de textura numa avaliação sensorial feita em iogurtes incorporados com bactérias nas formas encapsulada e livre. A característica não homogénea da pasta, que resulta da moenda mais ou menos grosseira da polpa da azeitona, poderá explicar estes resultados.

O parâmetro intenção de compra foi classificado em 5 pontos o que indica que poderá ser um produto a ser comercializado. O desvio padrão baixo sugere ainda que as classificações atribuídas pelos provadores a cada parâmetro nas três provas realizadas com as mesmas pastas foram consistentes. Para cada parâmetro em estudo, não foram encontradas diferenças significativas nas quatro modalidades ($P > 0,05$), podendo deduzir-se que a estirpe, nas formas livre ou encapsulada, em termos sensoriais não influencia as características da pasta de azeitona.

5. Conclusão

Este estudo demonstrou que as treze estirpes inicialmente selecionadas apresentam potenciais características probióticas, o que constitui uma mais valia para desenvolvimento de novos alimentos funcionais. Em termos de segurança e funcionalidade, as suas características demonstraram a não virulência das estirpes, a resistência às condições gastrointestinais, a sua colonização e competição com agentes patogénicos no ambiente gastrointestinal, registando-se, em alguns casos, resultados mais promissores que o respetivo controlo probiótico positivo, LCS.

A microencapsulação de *Lactobacillus plantarum* com alginato de sódio e amido de milho constitui um método eficaz para manter a sobrevivência das células durante um mês de armazenamento à temperatura de 4 °C. Nestas condições, as estirpes microencapsuladas mantêm viabilidade ou perdem apenas um ciclo logarítmico.

Em termos físicos, as cápsulas apresentam uma forma esférica e uniforme com um raio na ordem dos micrómetros.

Quando submetidas a um *stress* térmico, as cápsulas mostram melhor eficiência na proteção da estirpe 33, não se verificando diferenças e nas três temperaturas testadas.

No entanto, quando incorporadas na pasta de azeitona, as células microencapsuladas perdem viabilidade celular, mostrando o mesmo comportamento de células adicionadas na forma livre. Após 30 dias de armazenamento à temperatura de 4 °C, a estirpe 33 apresenta uma viabilidade na ordem 10^6 UFC/g, padrão mínimo para ser considerado um alimento probiótico.

Da avaliação dos parâmetros de cor, verifica-se que a estirpe 33 encapsulada, após o armazenamento e comparativamente com a pasta inicial apresenta menor diferença de cor total, parecendo que a estirpe é mais estável relativamente aos parâmetros de cor.

A avaliação sensorial indica que as cápsulas não foram detetadas pelos provadores quando incorporadas nas pastas, não havendo registo de diferenças entre as pastas incorporadas com células livres e encapsuladas.

De um modo geral, podemos deduzir que a estirpe 33 apresenta um grande potencial probiótico em termos funcionais e de segurança. Quando encapsulada, as suas propriedades tecnológicas parecem manter-se. Quando incorporada na pasta de azeitona consegue garantir a sua viabilidade dentro dos valores indicados para um alimento probiótico.

6. Perspetivas futuras

Nos ensaios para avaliação do potencial probiótico as estirpes selecionadas apresentaram valores positivos nos testes *in vitro* recomendados pela *Food and Agriculture Organization* das Nações Unidas e da Organização Mundial de Saúde (FAO/WHO, 2002). Apesar de candidatas adequadas a probióticos, devem ser efetuados estudos *in vivo* para confirmação dos resultados dos testes *in vitro*, bem como estudos que complementem a sua funcionalidade e eficácia em termos tecnológicos. É importante perceber se estas estirpes conseguem resistir ao processamento industrial, sobreviver e manter a sua funcionalidade durante a fase de armazenamento e no momento do consumo.

O uso de probióticos microencapsulados constitui uma alternativa promissora para a solução dos grandes problemas ainda enfrentados pela indústria de produção de alimentos probióticos. Considerando os resultados obtidos no presente estudo (perda de viabilidade celular), aquando a incorporação das estirpes de *Lactobacillus plantarum* encapsuladas na pasta de azeitona, torna-se importante perceber as razões por forma a ultrapassá-las. Nesta perspetiva, preconiza-se:

i) a elaboração de diferentes pastas de azeitonas cuja constituição passaria apenas por azeitona moída e adição de cada um dos ingredientes, separadamente, às quais se incorporariam bactérias encapsuladas. Esta metodologia possibilitaria uma melhor compreensão do efeito individual dos ingredientes, o que permitiria a otimização da formulação;

ii) substituição do material encapsulante usado ou alteração da técnica aplicada;

iii) formação de uma dupla camada no material encapsulado o que conferiria uma maior resistência com redução da sua permeabilidade;

iv) estudo da evolução das características da pasta de azeitona ao longo do armazenamento;

v) caracterização mais detalhada da pasta de azeitona, nomeadamente atividade antioxidante, determinação das cinzas, proteínas, glúcidos, gordura total e atividade da água;

vi) avaliação sensorial recorrendo a um maior número de provadores, mais diversificado para consolidação dos resultados e incluir na prova um controlo (pasta sem incorporação de bactérias).

7. Referências bibliográficas

- Abdullah, A., Cheng, T.G. (2001). Optimization of reduced calorie tropical mixed fruits jam. *Food Quality and Preference*. 12: 63–68.
- Abe, F., Muto, M., Yaeshima, T., Iwatsuki, K., Aihara, H., Ohashi, Y., Fujisawa, T. (2010). Safety evaluation of probiotic bifidobacteria by analysis of mucin degradation activity and translocation ability. *Anaerobe*. 16: 131–136.
- Afshari-Jouybarri, H., Farahnaky, A. (2011). Evaluation of photoshop software potential for food colorimetry. *Journal of Food Engineering*. 106: 170–175.
- Aguirrezábal, M.M., Mateo, J., Domínguez, M.C., Zumalacárregui, J.M. (2000). The effect of paprika, garlic and salt on rancidity in dry sausages. *Meat Science*. 54: 77–81.
- Ainsley-Reid, A., Vuilleumard, J.C., Britten, M., Arcand, Y., Farnworth, E., Champagne, C.P. (2005). Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca²⁺ - induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastrointestinal model. *Journal of Microencapsulation*. 22: 603–619.
- Alakomi, H.L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., Helander I.M. (2000). Lactic acid permeabilizes Gram negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2001–2005.
- Alderbeth, I., Cerquetti, M., Poilane, I., Wold, A.E., Collingon, A. (2000). Mechanisms of colonization and colonization resistance of the digestive tract. *Microbial Ecology of health and disease*. 12: 223–239.
- Alvarenga, N.B., Lidon, F.J.C., Silva, A., Martins, G., Cruz, T., Palma V., Canada, J. (2012). Production and characterization of green and black olive paste using cream of animal and vegetable origins. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 24: 12–16.
- Anal, A.K., Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and target delivery. *Trends in Food Science and Technology*. 18: 240–251.
- Anas, M., Eddine, J.H., Mebrouk, K. (2008). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Dairy & Food Sciences*. 3(2): 39–49.
- Anderson, R.C., Cookson, A.L., McNabb, W.C., Kelly, W.J., Roy, N.C. (2010). *Lactobacillus plantarum* DSM 2648 is a potential probiotic that enhances intestinal barrier function. *FEMS Microbial Letters*. 309: 184–192.
- Argyri, A.A., Zoumpopolou, G., Karatzas, G.K., Tsakalidou, E., Nychas, E.G., Panagou, Z.E., Tassou, C.C. (2013). Selection of probiotic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiology*. 33: 282–292.
- Ariful, M., Yun, C-H., Choi, Y-J., Cho, C-S., (2010). Microencapsulation of live probiotic bacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20(10): 1367–1377.
- Arora, D.S., Kaur, J. (1999). Antimicrobial activity of species. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 12(3): 257–262.
- Bae, H., Jayaprakasha, G.K., Jifon, J., Patil, B.S. (2012). Extraction efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis in peppers. *Food Chemistry*. 130: 751–758.

- Begley, M., Hill, C., Gahan, C.G.M. (2006). Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 1729–1738.
- Borek, C. (2001). Antioxidant health effects of aged garlic extract. *Journal of Nutrition*. 131: 1010S–1015S.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., Igc, R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chemistry*. 111: 925–929.
- Brito, D., Serrano, C., Pereira, A., Delgado, A., Oleastro, M., Monteiro, L., Peres, C. (2007). Evaluation of the inhibitory activity of *Lactobacillus* sp. from table-olives against *Helicobacter pylori* Abstrat no: PO91. *Helicobacter*. 12: 438.
- Bruni, A., Ballero, M., Poli, F. (1997). Quantitative ethnopharmacological study of the Campidano valley and Urzulei district, Sardinia, Italy. *Journal of Ethnopharmacology*. 57: 97–124.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*. 104: 467–483.
- C.O.I., 1980. Norma Qualitativa unificada aplicável às azeitonas de mesa e o comércio internacional. Madrid T/TO/Doc. 1.5.
- C.O.I., 2008. Table Olives. Autochthon varieties. Secondary characterization. Disponível em www.internationaloliveoil.org/resgen/esp/rg-var2-por.htm. Acedido em Abril de 2011.
- C.O.I.,2007. L'oléiculture au Portugal. E.108/Doc. n° 4 Mise à jour n° 31 Réf. 25.
- Callegari, E.M., Elli, M., Callegari, M.L., Ferrari, S., Veis, E., Cattivelli, D., Soldi, S., Morelli, L., Feuillerat, N.G., Antoine, J-M. (2006). Survival of yogurt bacteria in the human gut. *Applied Environmental Microbiology*. 72: 5113–5117.
- Capela, P., Hay, T.K.C., Shah, N.P. (2007). Effect of homogenisation on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria. *Food Research International*. 40: 1261–1269.
- Champagne, C.P., Fustier, P. (2007). Microencapsulation for delivery of probiotics and other ingredients in functional dairy products. *Functional dairy products*. 2: 404–426.
- Champagne, C.P., Mondou, F., Raymond, Y., Roy, D. (1996). Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Food Research International*. 29: 555–562.
- Charalampopoulos, D., Pandiella, S.S., Webb, C. (2002). Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 851–859.
- Chuah, A.M., Lee, Y.C., Yamaguchi, T., Takamura, H., Yin, L.J., Matoba, T. (2008). Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers. *Food Chemistry*. 111: 20–28.
- Collado, M.C., Meriluoto, J., Salminen, S. 2008. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*. 226: 1065–1073.
- Collado, M.C., Surono, I., Meriluoto, J., Salminen, S. (2007). Indigenous dadih lactic acid bacteria: Cell-surface properties and interactions with pathogens. *Journal of Food Science*. 72: M89–M93.

- Conte, U., Conti, B., Giunchedi, P., Maggi, L. (1994). Spray Dried Polylactide Microsphere Preparation: Influence of the Technological Parameters. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. Nova Iorque. Vol 20, pp 235–258.
- Dall'Acqua, S., Viola, G., Giorgetti, M., Loi, M.C., Innocenti, G. (2006). Two new sesquiterpene lactones from the leaves of *Laurus nobilis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 54: 1187–1189.
- De Palencia, P.F., López, P., Corbi, A.L., Peláez, C., Requena, T. (2008). Probiotic strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, in vitro adhesion to caco-2 cells and effect on cytokine secretion. *European Food Research Technology*. 227: 1475–1484.
- De Vuyst L., Foulquie M.R., Revets, H. (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in *Enterococci* of different origins. *International Journal of Food Microbiology*. 84: 299–318.
- De Vuyst, L., Avonts, L., Makras, E. (2004). Chapter 17. Probiotics, prebiotics and gut health. In: Remacle, C. e Reusens, B. (Eds.). *Functional foods, ageing and degenerative disease*. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, pp. 416-482.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli M., Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*. 31: 438–442.
- Desai, K.G.H., Park, H.J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*. 23: 1361–1394.
- Ding, W.K., Shah, N.P. (2007). Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science*. 72(9): 446–450.
- Ding, W.K., Shah, N.P. (2009). An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage and bile conditions storage. *Food Microbiology and Safety*. 74 (2): 53–61.
- Doleyres, Y., Lacroix, C. (2005). Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *International Dairy Journal*. 15: 973–988.
- Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Halloram, S., Feeney, M. (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. 6th Symposium on Lactic Acid Bacteria, Holanda.
- Dunne, C., O'mahony, L., Thornton, G., Feeney, M., Daly, C., O'Sullivan, G., Collins, J.K. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with *in vivo* findings. *American Journal of Clinical Nutritional*. 73: 386–392.
- Elgayyar M., Draughon, F.A., Golden, D.A., Mount, J.R. (2001). Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection*. 64: 1019–1024.
- El-Naggar, M.Y.M. (2004). Comparative Study of Probiotic Cultures to Control the Groth of *Escherichia coli* O 157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Biotechnology*. 3(2): 157–180.
- Eun Y.A., Younghoon, K., Sejong, O., Jee-Young, I., Dong-Jun, P., Kyoung, S.H., Kim, S.H. (2007). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridisation system. *International Journal of Food Science*. 42: 411–419.

- FAO/WHO. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization*. Córdoba, Argentina.
- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. *Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization*. London, Ontario, Canada.
- FAO/WHO. (2003). Codex Standard for Fermented Milks. Codex Stan 243. Disponível em: http://www.dairyconsultant.co.uk/pdf/codex_standard_fermented_milks_yogurts.pdf. Acedido em Março de 2013.
- Fernández, M.F., Boris, S., Barbes, C. (2005). Safety evaluation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* UO 004, a probiotic bacterium. *Research in Microbiology*. 156: 154–160.
- Fujisawa, H., Suma, K., Origuchi, K., Kumagai, H., Seki, T., Ariga, T. (2008). Biological and chemical stability of garlic derived allicin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 4229–4235.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66: 365–378.
- Fumiaki, A., Masamichi, M., Tomoko, Y., Iwatsuki, K., Hiroaki, A., Osashi, Y., Fujisawa, T. (2010). Safety evaluation of probiotic bifidobacteria by analysis of mucin degradation activity and translocation ability. *Anaerobe*. 16: 131–136.
- García-Closas, R., Berenguer, A., Tormo, M.J., Sanchez, M.J., Quiros, J.R., Navarro, C. (2004). Dietary sources of vitamin C, vitamin E and specific carotenoids in Spain. *British Journal of Nutrition*. 91: 1005–1011.
- Garrido-Fernández, A., Fernández Diez, M.J., e Adams, M.R. (1997). Physical and chemical characteristics of the olive fruit, p. 67-109. In A. Garrido-Fernández et al. (ed.), *Table olives*. Chapman & Hall, Londres.
- Garrido-Fernández, A., Lopez-Lopez, A. (2008). Revalorización nutricional de la Aceituna de mesa. Oral communication. II Jornadas Internacionales de la aceituna de mesa. 26-27 Março, Sevilha, Espanha. Interaceituna: Organización Interprofissional de la Aceituna de Mesa. Disponível em www.interaceituna.com/la-aceituna-de-mesa.html. Acedido em Abril de 2011.
- Gauthier, R. (2002). Intestinal health, the key to productivity (The case of organic acids). effect on the sensory properties of yoghurt. *Food Science and Technology*. 39(10): 1221–1227.
- Gibbs, B.F., Kermasha, S., Alli, I., Mulligan, C.N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 50(3): 213–224.
- Girolami, A., Napolitano, F., Faraone, D., Braghieri, A. (2013). Measurement of meat color using a computer vision system. *Meat Science*. 93: 111–118.
- Gu, R.X., Yang, Z.Q., Li, Z.H., Chen, S.L., Luo, Z.L. (2008). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi, China. *Anaerobe*. 14: 313–317.

- Guimarães, R.R., Vendramini, A.L.A., Santos, A.C., Leite, S.G.F., Miguel, M.A.L. (2013). Development of probiotic beads similar to fish eggs. *Journal of Functional Foods*. 5: 968–973.
- Guo, X.H., Kim, J.M., Nam, H.M., Park, S.Y., Kim, J.M. (2010). Screening lactic acid bacteria from swine origins or multi strain probiotics based on *in vitro* functional properties. *Anaerobe*. 16: 321–326.
- Hadley, S.P., Harty, W.S.D., Wyatt, E.J., Brown, R.C., Doran, P.J., Gibbs, C.C.A. (1987). A Comparison of the Adhesion, Coaggregation and Cell-surface Hydrophobicity Properties of Fibrillar and Fimbriate strains of *Streptococcus salivarius*. *Journal of General Microbiology*. 133: 3207–3217.
- Heatley, R.V., Sobala, G.M. (1993). Acid suppression and gastric flora. *Baillere's Clin. Gastroenterology*. 7: 167–181.
- Heidebach, T., Forst, P., Kulozik, U. (2012). Microencapsulation of Probiotic Cells for Food Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 52: 291–311.
- Heyman, M., Ducroc, R., Desjeux, J.F., Morgat, J.L. (1982). Horseradish-peroxidase transport across adult-rabbit jejunum *in vitro*. *American Journal of Physiology*. 242 (6): 558–564.
- Hofmann, A. F., Roda, A. (1984). Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem. *Journal of Lipid Research*. 25: 1477–1489.
- Holzappel, H.W., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Society for Clinical Nutrition*. 73: 365s–373s.
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis in't veld, J.H.J. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 41(2): 85–101.
- Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M.R., Yarmand, M.S., Razavi, S.H. (2008). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of symbiotic ice cream. *Food Chemistry*. 111: 50–55.
- Hughes, B.G., Lawson, L.D. (1991). Antimicrobial effects of *Allium sativum* (garlic), *Allium ampeloprasum* (elephant garlic) and *Allium cepa* (onion), garlic compounds and commercial garlic supplement products. *Phytotherapy Research*. 5: 154–158.
- Iñiguez-Palomares, C., Pérez-Morales, R., Acedo-Félix, E. (2007). Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. *Revista Latino Americana de Microbiologia*. 49: 46–54.
- Janoszka, B. (2010). 7-Ketocholesterol and 7-hydroxycholesterol in pork meat and its gravy thermally treated without additives and in the presence of onion and garlic. *Meat Science*. 86: 976–984.
- Jayalalitha, V., Balasundaram, B., Palanidorai, B. (2012). *In vitro* assessment of microencapsulated probiotic beads. *International Journal of Agriculture*. 2(1): 1–6.
- Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT- Food Science and Technology*. 39(10): 1221–1227.

- Kim, S., Cho, S.Y., Kim, S.H., Song, O., Shin, S., Cha, D.S., Park, H.J. (2008). Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *Food Science and Technology*. 41: 493–500.
- King, A.H. (1995). Encapsulation of food ingredients: A review of available technology, focusing on hydrocolloids. In: *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*, ACS Symposium Series 590, Ed. By Sara J. Risch and Gary A. Reineccius. American Chemical Society, Washington DC., 26–39.
- Klayraung, S., Viernstein, H., Sirithunyalug, J., Okonogi, S. (2008). Probiotic properties of lactobacilli isolated from thai traditional food. *Science Pharmaceutical*. 76: 485–503.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*. 13:3–13.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability on microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. 14: 737–743.
- Lavermicocca, P., Gobbetti, M., Corsetti, A., Caputo, L. (1998). Characterization of lactic acid bacteria isolated from olive phylloplane and table olive brines. *Italian Journal of Food Science*. 10: 27–39.
- Lehto, E.M., Salminen, S. (1997). Adhesion of two *Lactobacillus* strains, one *Lactococcus* and one *Propionibacterium* strain to cultured human intestinal Caco-2 cell line. *Bioscience Microflora*. 16: 13–17.
- Leitão, F., Potes, M.F., Calado, M.L., Almeida, F.J. (1986). Descrição de 22 Variedades de Oliveira Cultivadas em Portugal. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação. Direcção Geral de Planeamento e Agricultura. Lisboa.
- Loi, M.C., Poli, F., Sacchetti, G., Selenu, M.B., Ballero, M. (2004). Ethnopharmacology of ogliastra (Villagrande Strisaili, Sardinia, Italy). *Fitoterapia*. 75: 277–295.
- Mami, A., Henni, J.E., Kihal, M. (2008). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Dairy and Food Sciences*. 3: 39–49.
- Mandal, S., Puniya, A.K., Singh, K. (2006). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*. 16: 1190–1195.
- Maragkoudakis, A.P., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*. 16: 189–199.
- Marteau, P., de Vrese, M., Cellier, C.J. Schrezenmeir, J. (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73: 430S–436S.
- Mendoza, F., Dejmek, P., Aguilera, J.M. (2006). Calibrated color measurements of agricultural foods using image analysis. *Postharvest Biology and Technology*. 41(3): 285–295.
- Menéndez, J.A., Vázquez-Martín, A., Colomer, R., Carrasco-Pancorbo, García-Villalba, A.R., Fernández-Gutiérrez, A. (2007). Oleuropein aglycone, the bitter principle of olives and olive oil, is a potent anti-HER2 oncogene agent capable to reverse breast cancer acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin). *BMC Cancer*. 7: 1–19.

- Mortazavian, A.M., Ehsani, M.R., Azizi, A., Razavi, S.H., Mousavi, S.M., Sohrabvandi, S., Reinheimer, J.A. (2008). Viability of calcium-alginate-microencapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) during refrigerated storage and under simulated gastrointestinal conditions. *Australian Journal of Dairy Technology*. 63(1): 25–30.
- Mortazavian, A.M., Razavi, S. H., Ehsani, M. R., Sohrabvandi, S. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Irian Journal of Biotechnology*. 5(1): 1–18.
- Moskowitz, H., Gofman, A., Beckley, J. (2005). Using high-level consumer-research methods to create a tool-driven guidebook and database for product development and marketing. *Journal of Sensory Studies*. 21: 54-100.
- Ngo, S.N., Williams, D.B., Cobiac, L., Head, R.J. (2007). Does garlic reduce risk of colorectal cancer? A systematic review. *Journal of Nutrition*. 137: 2264–2269.
- Niku-Paavola, M.L., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T., Haikara, A. (1999). New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*. 86: 29–35.
- NP 1421/(1977) - Géneros alimentícios derivados de frutos e de produtos hortícolas. Determinação da acidez.
- NP 3034/(2012) – Azeitona de mesa. Definição, classificação, características, acondicionamento e rotulagem.
- Obadina, A.O., Oyewole, O.B., Sanni, L.O., Tomlins, K.I. (2006). Bio-preservative activities of *Lactobacillus plantarum* strains in fermenting Cassava ‘fufu’. *African Journal of Biotechnology*. 5: 620–623.
- Omar, S.H., Al-Wabel, N.A. (2010). Organosulfur compounds and possible mechanism of garlic in cancer. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 18: 51–58.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S.J. (1998). The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *International Dairy Journal*. 8(9): 749–758.
- Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, B., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. (2000). Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clinical Chemistry*. 46: 976–988.
- Parvez, S., Malik, K.A., Kang, S. Kim, H.Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. Review article. *Journal of Applied Microbiology*. 100: 1171–1185.
- Pintado, C., Peres, C., Peres, M.F., Henriques, L.R. (2006). Ácidos gordos componentes e fracção esteróica em azeites monovarietais das cultivares “GalegaVulgar” e “Azeiteira”. *Melhoramento*. 41: 204–208.
- Podsedeck, A. (2007). Natural antioxidant and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *Food Science and Technology*. 40: 1–11.
- Prado, F.C., Parada, J.L., Pandey, A., Soccol, C.R. (2008). Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*. 41: 111-123.
- Puertas-Mejia, M., Hillebrand, S., Stashenko, E., Winterhalter, P. (2002). *In vitro* radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*. 17: 380–384.

- Queiroz, Y.S., Ishimoto, E.Y., Bastos, D., Torres, E. (2009). Garlic (*Allium sativum* L.) and ready-to-eat garlic products: *In vitro* antioxidant activity. *Food Chemistry*. 115: 371–374.
- Ray, B., (2004). *Fundamental food microbiology*. 3ª edição. Boca Raton: CRC press.
- Reto, M., Peito, A., Lopes, T., Cordeiro, A.I., Peres, C. (2006 a). Teores de vitaminas do complexo B presentes em salmouras de azeitona de mesa de diversas cultivares. *Melhoramento*. 41: 290–296.
- Reto, M., Peito, A., Lopes, T., Cordeiro, A.I., Peres, C. (2006 b). Efeito do processamento no teor vitamínico de azeitonas de mesa. Ensaios iniciais. *Melhoramento*. 41: 297–302.
- Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. (1996). Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20: 933–956.
- Roberfroid, M.B. (2001) Prebiotics: preferential substrates for specific germs? *American Journal of Clinical Nutrition*. 73: 406–409.
- Rokka, S., Rantamaki, P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research Technology*. 231: 1–12.
- Roos, S., Lindgren, S., Jonsson, H. (1999). Autoaggregation of *Lactobacillus reuteri* is mediated by a putative DEAD-box helicase. *Molecular Microbiology*. 32(2): 427–436.
- Saad, S.M.I. (2006). Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 42: 1–16.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. 84: 197–215.
- Sabikhi, L., Babu, R., Thompkinson, D.K., Kapila S. (2010). Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. *Food Bioprocess Technology*. 3: 586–593.
- Sakoui, F., Harrabi, S., Absalon, C., Sbei, K., Boukhchina, S., Kallel, H. (2008). α - Tocopherol and fatty acids contents of some Tunisian table olives (*Olea europea* L.): Changes in their composition during ripening and processing. *Food Chemistry*. 108: 833–839.
- Salminen, S., Isolauri, E., Salminen, E. (1996). Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains for future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70: 347–358.
- Salminen, S., Ouwehand, A. G., Isolauri, E. (1998). Clinical applications of probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. 8: 563–572.
- Sanders, M.E., Gibson, G., Gill, H.S. (2007). Probiotics: Their Potential to Impact Human Health. CAST issue paper No. 36. Disponível em: <http://crossfitwv.typepad.com/files/cast-probiotics-issue-paper-final144.pdf>. Acedido em Março de 2013.
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., Foerst, P. (2007). Alternative drying process for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnology Progress*. 23(2): 302–315.
- Silva, S., Fernandes, J., Pintado, C., Catulo, L., Peres, C., Bronze, M.R. (2007). Perfil de compostos fenólicos e sensorial em azeitona de mesa da cultivar 'Azeiteira': estudos de fermentação com *Lactobacillus pentosus*. In Actas do 8º Encontro de Química de Alimentos. Alimentos tradicionais, alimentos saudáveis e rastreabilidade. Pp. 399–402.

- Silva, S., Gomes, L., Leitão, F., Coelho, A.V., Vilas Boas, L. (2006). Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L.: fruits and leaves. *Food Science Technology International*. 12(5): 385–396.
- Simova, E.D., Beshkova, D.B., Dimitrov, Z.P. (2009). Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian dairy products. *Journal of Applied Microbiology*. 106: 692–701.
- Socol, C.R., de Souza Vandenberghe, L.P., Rigon Spier, M., Pedroni Medeiros, A.B., Yamagishi, C.T., De Dea Lindner, J., Pandey, A., Thomaz-Socol, V. (2010). The Potential of Probiotics: A Review. *Food Technology and Biotechnology*. 48: 413–434.
- Sokovic, M., Tzakou, O., Pitarokili, D., Couladis, M. (2002). Antifungal activities of selected aromatic plants growing wild in Greece. *Nahrung*. 46: 317–320.
- Soomro, A.H, Masud T., Anwaar, K. (2002). Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and Human Health- A Review. *Pakistan Journal of Nutrition*. 1: 20–24.
- Taheri, H., Tabandeh, F., Moravej, H., Zaghahari, M., Shivazad, M., Shariati, P. (2009). Potential probiotic of *Lactobacillus johnsonii* LT 171 for chicken nutrition. *African Journal of Biotechnology*. 8(21): 5833–5837.
- Tajkarimi, M.M.; Ibrahim, S.A., Cliver, D.O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 21: 1199–1218.
- Takeshi, H., Yuxin, N., Toshio, M. (1988). Purification and characterization of hemolysin produced by a clinical isolated of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infection and Immunity*. 56(4): 961–965.
- Teixeira, P.C., Castro, M.H., Malcata, F.X., Kirby, R.M. (1995). Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* following spray-drying. *Journal of Dairy Science*. 78(5): 1025–1031.
- Thomson, M., Al-Qattan, K.K., Bordia T., Ali, M. (2006). Including garlic in the diet may help lower blood glucose, cholesterol, and triglycerides. *Journal of Nutrition*. 136: 800S–802S.
- Todorov, S.D., Botes, M., Guigas, C., Schillinger, U., Wiid, I., Wachsman, M.B., Holzappel, W. H., Dicks, L.M.T. (2008). Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 104: 465–477.
- Torriani, S., Felis, G.E., Dellaglio, F. (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 3450–3454.
- Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E., Salminen, S. (2001). Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73: 393S–398S.
- Tuomola, E.M., Salminen, S.J. (1998). Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology*. 41: 45–51.
- Vaio, C.D., Grazianib, G., Gasparib, A., Scaglionea, G., Nocerinoa, S., Ritieni A. (2010). Essential oils content and antioxidant properties of peel ethanol extract in 18 lemon cultivars. *Scientia Horticulturae*. 126: 50–55.
- Vale-Silva, L., Silva, M.J., Oliveira, D., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., Pinto, E. (2012). Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum vulgare* subsp.

virens with their in vitro activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi. *Journal of Medical Microbiology*. 61: 252–60.

Van-Gils, C.H., Peeters, P.H.M., Bueno-de-Mesquita, H.B., Boshuizen, H.C., Lahmann, P.H., Clavel-Chapelon, F., Thiebaut, A., Kesse, E., Sieri, S., Palli, D. (2005). Consumption of vegetables and fruits and risk of breast cancer. *Journal of the American Medical Association*. 293: 183–193.

Vidhyalakshmi, R., Bhakayaraj, R., Subhasree, R.S. (2009). Encapsulation “The Future of Probiotics” - A Review. *Advances in Biological Research*. 3(3-4): 96–103.

Vinderola, C.G., Medici, M., Perdigi, G. (2004). Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 93: 794–799.

Vinderola, G., Binetti, A., Burns, P., Reinheimer, J. (2011). Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products. *Food Microbiology*. 2: 1–6.

Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J., Hecht, T. (2004). Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish Diseases*. 27: 319–326.

Visioli, F., Galli, C. (2001). The role of antioxidants in the mediterranean diet. *Lipids*, 36: S49–S52.

Wassenaar, T.M., Klein, G. (2008). Safety aspects and implications of regulation of probiotic bacteria in food supplements. *Journal of Food Protection*. 71(8): 1734-1741.

Yam, K., Papadakis, S. E. (2004). A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *Journal of Food surfaces*. 61: 137–142.

Zárate, G., Morata de Ambrosini, V.I., Chaia, A.P., González, S.N. (2002). Adhesion of propionibacteria to intestinal epithelial tissue *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Food Protection*. 65: 534–539.

Zheng, W., Wang, S. (2001). Antioxidant activity and phenolic composition in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 5165–5170.

Zhou, J.S., Gopalb, P.K., Gilla, H.S. (2001). Potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin *in vitro*. *International Journal of Food Microbiology*. 63: 81–90.

Zhou, X.X., Pan Y.J., Wang, Y.B., Li, W.F. (2007). *In vitro* assessment of gastrointestinal viability of two photosynthetic bacteria, *Rhodospseudomonas palustris* and *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Zhejiang University Science B*. 8: 686–692.