

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS  
QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

JOSEANE CRISTINA BASSANI

**IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS MICROBIANAS EM ESFERAS DE  
ALGINATO DE CÁLCIO E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR  
E ESTABILIDADE BIOQUÍMICA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE  
ARMAZENAMENTO**

DISSERTAÇÃO

Pato Branco  
2018

**JOSEANE CRISTINA BASSANI**

**IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS MICROBIANAS EM ESFERAS DE  
ALGINATO DE CÁLCIO E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR  
E ESTABILIDADE BIOQUÍMICA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE  
ARMAZENAMENTO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Área de Concentração: Química de Alimentos.

Professor Orientador: Dr. Edimir Andrade Pereira

Professor Co-orientador: Dr. Mário Antônio Alves da Cunha

Pato Branco  
2018

B317i

Bassani, Joseane Cristina.

Imobilização de células microbianas em esferas de alginato de cálcio e avaliação da viabilidade celular e estabilidade bioquímica em diferentes condições de armazenamento / Joseane Cristina Bassani. -- 2018.

75 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Edimir Andrade Pereira

Coorientador: Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Pato Branco, PR, 2018.

Bibliografia: f. 65 - 75.

1. Células. 2. Enterobactérias. 3. Escherichia coli. 4. Microbiologia. I. Pereira, Edimir Andrade, orient. II. Cunha, Mário Antônio Alves da, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. IV. Título.

CDD (22. ed.) 660.281

Ficha Catalográfica elaborada por  
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630  
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Câmpus Pato Branco

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de



## TERMO DE APROVAÇÃO Nº 77

### Título da Dissertação

***IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS MICROBIANAS EM ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E ESTABILIDADE BIOQUÍMICA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO***

### Autora

**Joseane Cristina Bassani**

Esta dissertação foi apresentada às 14 horas do dia 31 de julho de 2018, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de pesquisa em química de alimentos – no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. A autora foi arguida pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.

---

Prof. Dr. Edimir Andrade Pereira  
UTFPR/PB  
Orientador

---

Profa. Dra. Aniela Pinto Kempka  
UDESC/Pinhalzinho  
Examinadora

---

Profa. Dra. Vidianny Aparecida Queiroz Santos  
UTFPR/PB  
Examinadora

Visto da Coordenação

**Profa. Dra. Marina Leite Mitterer Daltoe**

Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em  
Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos-PPGTP

**O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do PPGTP**

*Dedico este trabalho*

*À minha mãe Irene Lóss Bassani, que é meu exemplo de vida e que por inúmeras vezes renunciou os seus sonhos em função dos meus.*

*Ao Paulo R. Martinelli que mesmo do seu jeito esteve ao meu lado apoiando.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por a cada dia me ensinar a ter fé e paciência que tudo pode ser alcançado.

À minha mãe por me mostrar, através dos seus exemplos, que quando trabalhamos com amor e respeito a colheita é abundante.

Ao Paulo por caminhar ao meu lado, respeitando e compreendendo minhas escolhas.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela acolhida.

Ao meu orientador Edimir Andrade Pereira, que aceitou a orientação e que nesse período me incentivou e motivou sempre com palavras gentis. Obrigada pela confiança e disponibilidade, a sua contribuição foi muito além do meu desenvolvimento intelectual.

Ao meu co-orientador Mário Antônio Alves da Cunha, por toda a ajuda e disponibilidade. Pelo incentivo e atenção. Aprendi muito com você.

Ao Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial, em especial a Leania Maria Fabbi pelo incentivo e liberação para que eu pudesse executar as atividades do mestrado.

À minha irmã do coração Lilian Daiana Haupenthal, amiga que caminha comigo nessa jornada de aprendizado. Muito devo a ti pelo incentivo, acolhida e cama quentinha. Tua amizade é fundamental na minha vida.

Aos colegas de trabalho do SENAI, por compreender minha ausência, em especial a Daiane Chiarello pelo auxílio nas análises.

Aos amigos e colegas do programa. Em especial à Maria Fernanda Ribas amiga que o mestrado me deu.

À Central de Análises da UTFPR – Câmpus Pato Branco.

***“O custo do resultado é o esforço.”***

***(Leandro Karnal)***

## RESUMO

BASSANI, Joseane Cristina. **Imobilização de células microbianas em esferas de alginato de cálcio e avaliação da viabilidade celular e estabilidade bioquímica em diferentes condições de armazenamento.** 2018. 75 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, PR, 2018.

A preservação de culturas microbianas tem como objetivo manter a viabilidade da cultura, sem que ocorram mudanças morfológicas, fisiológicas ou genéticas, proporcionando assim a estabilidade celular. Neste estudo a técnica de imobilização celular foi pesquisada como uma nova proposta para a manutenção e preservação de culturas microbianas. Células de *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes* foram aprisionadas em esferas de alginato de cálcio, as quais foram submetidas a diferentes condições de armazenamento por 240 dias. Esferas úmidas foram mantidas sob condições de refrigeração (5 °C) e ultracongelamento (-60 °C) e esferas liofilizadas foram mantidas sob congelamento (-18 °C). A viabilidade e a estabilidade bioquímica das células microbianas imobilizadas durante o período de armazenamento foram avaliadas pelo método de Petrifilm e pelo sistema automatizado de identificação de microrganismos VITEK 2, respectivamente. Além disso, o aspecto morfológico das esferas foram avaliados por microscopia ótica (OM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). O método de imobilização empregado alcançou eficiência superior a 99% em esferas de tamanho uniforme com diâmetro médio de 3,52 mm. Os resultados de microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura revelaram para as esferas úmidas o formato esférico com característica espessa e pequenas irregularidades na superfície. Para as esferas liofilizadas, as técnicas de microscopia revelaram a característica esférica com superfície enrugada e sulcos bem definidos, sendo possível observar as células aglomeradas entre os poros. As células de *E. aerogenes* aprisionadas nas esferas de alginato de cálcio mantidas úmidas sob refrigeração e liofilizadas sob congelamento mostraram viabilidade e mantiveram a estabilidade bioquímica durante 240 dias de armazenamento. A manutenção das esferas úmidas sob ultracongelamento permitiu a viabilidade das células de *E. aerogenes* por 150 dias. A viabilidade das células de *E. coli* foi mantida durante todo o período e sob todas as condições de armazenamento estudadas. No entanto alterações bioquímicas, resultando em inibição enzimática das  $\beta$ -galactosidase e  $\beta$ -glucuronidase, foram percebidas ao longo dos 240 dias de armazenamento, sendo que o armazenamento das esferas liofilizadas sob congelamento foi o que preservou as características das células por um período de tempo maior (150 dias). Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a imobilização em esferas liofilizadas armazenadas sob congelamento alcançam os melhores resultados de conservação das células *E. coli* e *E. aerogenes*. Tais resultados indicam a imobilização celular em esferas de alginato de cálcio como uma técnica promissora para a manutenção das culturas de *E. coli* e *E. Aerogenes*.

**Palavras-Chave:** Aprisionamento celular; *Enterobacter aerogenes*; *Escherichia coli*; Preservação de culturas.



## ABSTRACT

BASSANI, Joseane Cristina. **Immobilization of microbial cells in calcium alginate beads and evaluation of cell viability and biochemical stability under different storage conditions.** 2018. 75 f. Dissertation (Master degree in Technology of Chemical and Biochemical Processes) - Postgraduate Program in Technology of Chemical and Biochemical Processes. Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, PR, 2018.

The preservation of microbial cultures aims to maintain the viability of the crop, without any morphological, physiological or genetic changes occur, providing cell stability. In this study the cellular immobilization technique was studied as a new proposal for the maintenance and preservation of microbial cultures. *Escherichia coli* and *Enterobacter aerogenes* cells were entrapped in calcium alginate beads, which were submitted to different storage conditions for 240 days. Moist spheres were maintained under refrigeration (5 °C) conditions and deep freezing (-60 °C) and lyophilized beads were kept under freezing (-18 °C). The viability and biochemical stability of the immobilized microbial cells during the storage period were evaluated by the Petrifilm method and the automated microorganism identification system (VITEK 2), respectively. In addition, the morphology of the beads was evaluated by optical microscopy (OM) and scanning electron microscopy (SEM). The immobilization method employed achieved efficiency over 99% in spheres of uniform size with a mean diameter of 3.52 mm. The results of OM e SEM revealed spherical shape with a thick characteristic and small irregularities on the surface for the wet spheres. For the lyophilized spheres, the microscopy techniques revealed the spherical characteristic with wrinkled surface and well-defined grooves, being possible to observe cells bonded between the pores. *E. aerogenes* cells entrapped in calcium alginate beads kept moist under refrigeration and lyophilized under freezing showed viability and kept biochemical stability during 240 days of storage. The maintenance of the wet spheres under ultra-freezing allowed the viability of *E. aerogenes* cells for 150 days. The viability of *E. coli* cells was maintained during the entire period under all storage conditions studied. However, biochemical changes resulting in enzymatic inhibition of  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -glucuronidase were observed throughout the 240 days of storage, and the storage of lyophilized beads under freezing preserved the characteristics of the cells for a greater period (150 days). The results obtained in this study suggest that the immobilization in lyophilized beads stores under freezing reach the best results of preservation of *E. coli* and *E. aerogenes* cells. These results indicate cellular immobilization in calcium alginate beads as a promising technique for the maintenance of *E. coli* and *E. aerogenes* cultures.

**Keywords:** Cell entrapment; Culture preservation; *Enterobacter aerogenes*; *Escherichia coli*.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais gêneros e espécies da família <i>Enterobacteriaceae</i> .....	28
Tabela 2- Diferenciação bioquímica dos principais gêneros de <i>Enterobacteriaceae</i>	29
Tabela 3 - Diferenciação de espécie do gênero <i>Escherichia</i> .....	31
Tabela 4 - Identificação bioquímica da <i>Enterobacter aerogenes</i> .....	33
Tabela 5 - Armazenamento das esferas. ....	37
Tabela 6 – Substratos do cartão GN. ....	42
Tabela 7 - Resultados de eficiência de imobilização para <i>E. coli</i> e <i>E. aerogenes</i> .....	46
Tabela 8 - Diâmetro médio e desvio padrão (mm) das esferas durante o período de armazenamento. ....	48
Tabela 9 - Efeito das temperaturas de refrigeração e ultracongelamento na sobrevivência de <i>Enterobacter aerogenes</i> encapsulado conservado na forma úmida .....	54
Tabela 10 - Efeito das temperaturas de refrigeração e ultracongelamento na sobrevivência de <i>Escherichia coli</i> encapsulado conservado na forma úmida .....	54

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Métodos de imobilização celular .....	21
Figura 2. Tipos de ligação entre a célula e o suporte de imobilização. ....	22
Figura 3. Representação estrutural de uma cápsula com células microbianas aprisionadas .....	23
Figura 4. O gotejamento do alginato de sódio em solução de cloreto de cálcio produz uma malha de textura gelatinosa de formato esférico através do mecanismo de gelificação iônica, onde ficam aprisionadas as células. ....	25
Figura 5. Fluxograma das atividades para o estudo da imobilização de células microbianas em alginato de cálcio, caracterização da morfologia das esferas, valiação da estabilidade bioquímica e da viabilidade celular para cada um dos microrganismos: <i>Escherichia coli</i> e <i>Enterobacter aerogenes</i> . ....	35
Figura 6. Preparo das esferas de alginato .....	38
Figura 7. Contagem de <i>E. coli</i> = 49 colônias azuis com gás; Contagem de Coliformes Totais = 87 colônias vermelhas e azuis com gás .....	39
Figura 8. Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> = 13.....	40
Figura 9. Vitek 2 .....	41
Figura 10. Diâmetro médio das esferas e <i>E. coli</i> e <i>E. aerogenes</i> .....	47
Figura 11. Microscopia Ótica das esferas liofilizadas (A) aumento de 40 X e contraste C, (B) aumento de 40 X e contraste PH2, (C) aumento de 100 X e contraste C, (D) aumento de 200 X e contraste PH2. ....	50
Figura 12. Microscopia Ótica das esferas úmidas (A) aumento de 40 X e contraste C, (B) aumento de 100 X e contraste C. ....	50
Figura 13. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das esferas úmidas. ....	51
Figura 14. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das esferas liofilizadas. ....	51
Figura 15. Resultado da identificação de <i>E. coli</i> obtido após o processo de imobilização.....	52
Figura 16. Resultado da identificação de <i>E. aerogenes</i> obtido após o processo de imobilização.....	52
Figura 17. Viabilidade dos microrganismos antes e após o processo de secagem por liofilização;.....	57
Figura 18. Viabilidade do <i>Enterobacter aerogenes</i> liofilizado armazenado sob congelamento.....	58

Figura 19. Viabilidade da *Escherichia coli* liofilizada armazenada sob congelamento.

..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 20 Crescimento atípico de *E. coli* em placa de petri. Colônias vermelhas sem produção da enzima beta glucuronidase e sem produção de gás. ....61

Figura 21 Resultado da identificação de *E. coli* após o período de 240 dias de armazenamento para as eferas E.cUR, E.cUC e E.cLC. ....62

Figura 22 Crescimento de colonias típicas de *E. aerogenes*: a-E.aUC em 150 dias, b-E.aUR em 240 dias e c-E.aLC em 240 dias. ....64

Figura 23 Resultado da identificação de *E.aerogenes* após o período de 240 dias de armazenamento para as eferas *E.aUR* e *E.cLC*. ....64

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
AOAC	Official Method of Analysis
ATCC	American Type Culture Collection
<i>E.aLC</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> liofilizada congelada
<i>E.aUC</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> úmida congelada
<i>E.aUR</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> úmida refrigerada
<i>E.cLC</i>	<i>Escherichia coli</i> liofilizada congelada
<i>E.cUC</i>	<i>Escherichia coli</i> úmida congelada
<i>E.cUR</i>	<i>Escherichia coli</i> úmida refrigerada
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
rpm	Rotações por Minuto

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>18</b>
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1 TÉCNICAS DE MANUTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DE MICRORGANISMOS</b>	<b>19</b>
<b>3.1.2. Métodos de imobilização visando manutenção microbiana</b> .....	<b>20</b>
3.1.2.1 Método de Ligação a suporte sólido.....	22
3.1.2.2 Método de Encapsulação/Aprisionamento .....	23
<b>3.2 SUPORTES UTILIZADOS PARA IMOBILIZAÇÃO</b> .....	<b>26</b>
<b>3.3 ENTEROBACTÉRIAS</b> .....	<b>27</b>
3.3.1. <i>Escherichia coli</i> .....	30
3.3.2. <i>Enterobacter aerogenes</i> .....	32
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
<b>4.1 MATERIAL</b> .....	<b>33</b>
<b>4.2 MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
4.2.1 Preparo dos inóculos.....	36
4.2.2 Preparo das esferas de alginato de sódio .....	36
4.2.3 Contagem de <i>Escherichia coli</i> e <i>Enterobacter aerogenes</i> pela técnica de Petrifilm™ .....	38
4.2.4 Identificação bacteriana pelo método de análise bioquímica automatizada (VITEK 2).....	41
4.2.5 Avaliação da eficiência da imobilização .....	43
4.2.6 Avaliação da viabilidade celular e comportamento bioquímico dos microrganismos .....	44
4.2.7 Determinação do diâmetro e morfologia das esferas .....	44
4.2.8 Análises estatísticas .....	45
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>5.1 PREPARO DAS ESFERAS DE ALGINATO DE SÓDIO</b> .....	<b>45</b>
<b>5.2 EFICIÊNCIA DA IMOBILIZAÇÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>5.3 TAMANHO E MORFOLOGIA DAS ESFERAS</b> .....	<b>47</b>

<b>5.4 COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO DA <i>E. COLI</i> E <i>E. AEROGENES</i> APÓS O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>5.5 VIABILIDADE DAS ESFERAS DE <i>E. COLI</i> E <i>E. AEROGENES</i> ÚMIDAS DURANTE O PERÍODO DE ARMAZENAMENTO EM DIFERENTES TEMPERATURAS .....</b>	<b>53</b>
<b>5.6 VIABILIDADE DAS ESFERAS DE <i>E. COLI</i> E <i>E. AEROGENES</i> LIOFILIZADAS DURANTE O PERÍODO DE ARMAZENAMENTO SOB CONGELAMENTO.....</b>	<b>57</b>
<b>5.7 COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO DAS ESFERAS DE <i>E. COLI</i> E <i>E. AEROGENES</i> ÚMIDAS E LIOFILIZADAS DURANTE O PERÍODO DE ARMAZENAMENTO EM DIFERENTES TEMPERATURAS .....</b>	<b>60</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>65</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES PARA FUTUROS ESTUDOS.....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Com os constantes progressos na área de microbiologia, a bioprospecção de microrganismos em processos biotecnológicos e em pesquisas é crescente. Para a adequada exploração das potencialidades dos microrganismos é necessário que estes estejam disponíveis, sejam de fácil transporte e mantenham suas características e viabilidade celular. A manutenção e preservação de culturas microbianas de acordo com Sola et al. (2012) é essencial devido a necessidade da utilização do organismo ou espécime a qualquer momento, seja para fins experimentais, didáticos, industriais ou estudos comparativos.

A preservação microbiana tem como objetivo manter a viabilidade da cultura, sem que ocorram mudanças morfológicas, fisiológicas ou genéticas, proporcionando a estabilidade celular. Neste contexto, pesquisas são necessárias para contornar problemas de mutação genética, perdas de características bioquímicas e viabilidade celular durante os processos de armazenamento.

Para tanto, diferentes técnicas de conservação e estocagem são propostas na literatura, porém, nenhuma tem se mostrado inteiramente eficaz, sendo requerida a combinação de dois ou mais métodos, para garantir a recuperação das cepas de cultura (GIRÃO et al., 2004).

A escolha de determinada técnica de manutenção celular é comumente baseada nas características dos isolados, na facilidade de emprego, e nos custos envolvidos no processo.

Em bioprocessos, microrganismos têm sido microencapsulados ou imobilizados buscando o reciclo e reutilização dos mesmos na produção de metabólitos de interesse industrial, para protegê-los contra presença de oxigênio, contra temperaturas de congelamento e ainda para aumentar a estabilidade e manter a viabilidade da cultura (PAULO et al., 2009; GÓRAK e ŻYMAŃCZYK, 2017).

Diferentes métodos de imobilização celular, incluindo o aprisionamento em matriz porosa, como gel de alginato, têm sido propostos visando a obtenção de células com alta atividade e estabilidade para serem empregadas em bioprocessos (CHEN et al., 2004). Entretanto, pouco tem sido descrito sobre o uso de técnicas de imobilização como ferramenta para a manutenção celular.



O aprisionamento de células em gel de alginato é uma técnica muito difundida para a imobilização de células viáveis, pelo fato da geleificação do alginato acontecer de forma rápida, permitindo a preservação e a viabilidade dos microrganismos (SANTANA et al., 2009).

O método de imobilização por aprisionamento em gel é fácil de implementar. A execução é simplificada, tem baixo custo e não utiliza altas temperaturas, o que não danifica as células mantendo a viabilidade elevada.

O estudo da conservação de amostras biológicas em longo prazo, para os bancos de coleções de cultura, representa uma ferramenta essencial para as pesquisas biomédicas, biológicas e industriais e para diagnósticos laboratoriais.

As coleções de cultura têm ganhado importância, também no cenário microbiológico, pois permitem estudar as características genéticas dos microrganismos com possibilidade de utilização destes em várias áreas da pesquisa incluindo a saúde. Já para laboratórios de análises de alimentos estes microrganismos podem ser utilizados como materiais de referência, pois contribuem para a segurança dos resultados das análises, permitindo a verificação da exatidão das medições garantido maior confiabilidade, além de fornecer referência para pesquisas.

A escolha dos microrganismos *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes* é justificada pela importância e uso destes como indicadores de qualidade na indústria de alimentos.

A família *Enterobacteriaceae* corresponde a bactérias gram-negativas, não esporuladas, sendo considerado um dos grupos mais importantes conhecidos pelo homem, compreendendo uma série de importantes patógenos e deteriorantes de alimentos, incluindo a *E. coli* e o *E. aerogenes* (BAYLIS et al., 2011).

Esses microrganismos são importantes patógenos transmitidos por alimentos, podendo ser indicadores de contaminação fecal, tendo importância no cenário nacional e internacional, seja nas questões de saúde pública devido a doenças veiculadas por alimentos ou para pesquisas aplicadas. Portanto, faz-se necessário estudar métodos eficientes para sua conservação e manutenção da viabilidade celular.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo estudar a imobilização de células de *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes* em esferas de alginato de cálcio como uma técnica de manutenção celular.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a imobilização de *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes* em alginato de cálcio como técnica de manutenção celular.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar esferas contendo *Escherichia coli* e esferas contendo *Enterobacter aerogenes* em matriz de alginato de cálcio usando a técnica de aprisionamento em matriz pelo método de extrusão.
- Avaliar a viabilidade da *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes* após o processo de imobilização.
- Submeter as esferas contendo os microrganismos imobilizados em três diferentes condições de armazenamento (esferas úmidas refrigeradas, esferas úmidas ultracongeladas e esferas liofilizadas e congeladas).
- Caracterizar a morfologia das esferas de alginato por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e microscopia ótica.
- Monitorar a viabilidade celular e a estabilidade bioquímica dos microrganismos imobilizados em esferas de alginato de cálcio por um período de 240 dias nas diferentes condições de armazenamento.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 TÉCNICAS DE MANUTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DE MICRORGANISMOS

O isolamento, identificação, conservação e uso de microrganismos se caracterizam como práticas imprescindíveis para o desenvolvimento de pesquisas, processos e obtenção de produtos de interesse econômico (GIRÃO et al., 2004).

No âmbito da ciência, a implantação e manutenção de coleções de culturas permitem a formação de estoques de cepas, que podem ser utilizadas experimentalmente em diferentes momentos (GUEDES et al., 1998).

Diante da necessidade da preservação de microrganismos, o objetivo não é somente conservar seu estado inicial evitando mutações indesejáveis, mas também garantir ao máximo a vitalidade das células e a quantidade de células viáveis (PAOLI, 2005; OKAFOR, 2007; TRABELSI et al. 2014).

Levando em consideração as exigências dos microrganismos e objetivo de sua utilização, a manutenção de estirpes pode ser por curtos períodos (dias ou meses), onde as culturas microbianas são mantidas a temperaturas de refrigeração (4 a 10 °C). No entanto, se for requerido à conservação prolongada, é necessário optar pela criopreservação, por meio do armazenamento em freezers a -80 °C, em nitrogênio líquido a -196 °C ou o processo de liofilização, que consiste no congelamento e desidratação das células em atmosfera de vácuo (PELCZAR et al., 1996; TORTORA et al., 2011).

Sabe-se que os métodos de liofilização e criopreservação são os mais empregados para a preservação de células microbianas, garantindo sua estocagem por longos períodos.

Okafor (2007) afirma ser importante que os organismos com potencial genético permaneçam inalterados e estejam constantemente disponíveis. Este autor destaca que vários métodos já foram estudados para preservar culturas microbianas, porém nenhum método é adequado para preservar todos os tipos de organismos. Portanto, o método mais adequado deve ser determinado experimentalmente.

Ainda segundo Okafor (2007), os métodos empregados na preservação de microrganismos devem envolver a redução da taxa metabólica, com isso haverá a diminuição das chances de ocorrência de mutações. As principais formas de redução do metabolismo são conseguidas por meio dos princípios: diminuição da temperatura de crescimento do organismo; desidratação ou dessecação do meio de crescimento; e limitação de nutrientes disponíveis para o organismo. Na prática os métodos de preservação combinam um ou mais princípios.

Buscando a maior viabilidade e estabilidade, bem como o aumento do período de sobrevivência, inúmeras técnicas de imobilização de células vêm sendo estudadas. A encapsulação de bactérias consiste na formação de pequenas esferas formadas a partir de um material protetor, geralmente de natureza polimérica, que recobre pequenos conjuntos de células, aprisionando-as e reduzindo sua exposição a fatores externos (VILLENA et al., 2009; TIANI et al., 2017).

A imobilização pode ser aplicada tanto em microrganismos como em enzimas e tem como uma vantagem a facilidade de recuperação do agente biológico (MALAJOVICH, 2009; MOHAMAD et al., 2015).

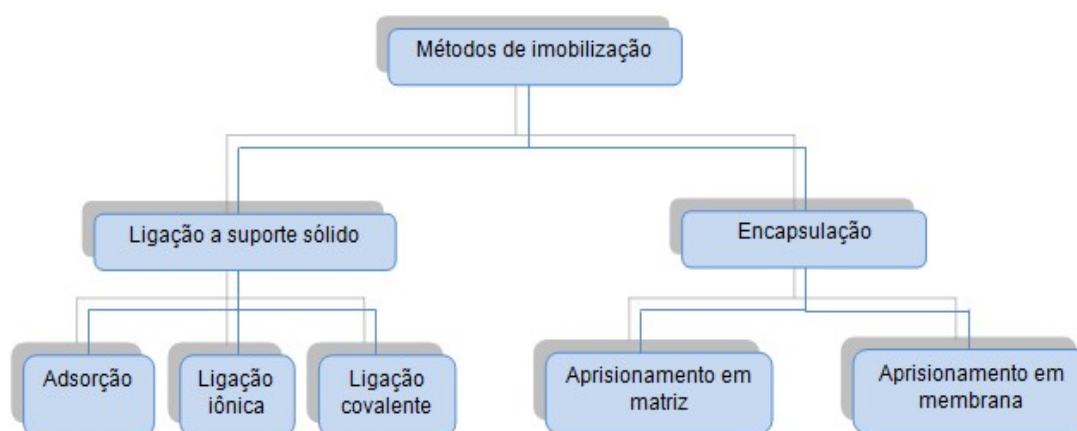
De maneira geral, todos os métodos de imobilização induzem alterações no crescimento, na fisiologia e na atividade metabólica de bactérias, leveduras e fungos. Promovendo a formação de inoculante sólido de manuseio, aplicação e transporte facilitados. Sendo que as células microbianas imobilizadas permanecem viáveis quando armazenadas por longos períodos (COVIZZI et al., 2007; ELIZEI et al., 2014).

### **3.1.2. Métodos de imobilização visando manutenção microbiana**

A imobilização celular pode ser definida como o confinamento físico de células viáveis em uma região definida de espaço (suporte) exibindo características diferentes daquelas do meio a seu redor e mantendo suas atividades catalíticas. As células podem ser imobilizadas dentro ou na superfície de um agente imobilizador (BATISTA, 2005; ELIZEI, 2009; COVIZZI et al., 2007; VOS et al., 2010; MILESSI, 2012).

Existem dois tipos de leitos para imobilização de células: os que aderem à superfície e os que aprisionam fisicamente. No primeiro tipo, as células são fixadas ao suporte de imobilização por ligações químicas. No segundo tipo, as células são encapsuladas/aprisionadas em glóbulos ou fibras de polissacarídeo, proteínas ou polímeros sintéticos (ELIZEI, 2009). Na Figura 1 destacam-se os principais métodos de imobilização.

**Figura 1.** Métodos de imobilização celular



Fonte: Adaptado de Wendhausen (1998).

Os métodos mais empregados nos processos de imobilização são adsorção, ligação covalente e aprisionamento em gel (KOSSEVA et al., 2009).

A tecnologia de imobilização é efetiva no aumento da densidade celular, proteção do organismo imobilizado durante o armazenamento e processamento, melhora a resistência à contaminação além de manter a estabilidade química e física das células (TRABELSI et al., 2014).

Mesmo que o uso de células imobilizadas em processos biotecnológicos tenha grandes vantagens, métodos sobre a sua utilização em processos de preservação de células ainda são pouco investigados (LIMA, 2011).

### 3.1.2.1 Método de Ligação a suporte sólido

O método de imobilização por meio de ligação a suporte sólido é considerado simples e barato. Não requer a ativação do suporte e possibilita a regeneração da matriz utilizada. Esse método envolve a adesão celular ao suporte de imobilização por meio de ligações iônicas ou covalentes (MILESSI, 2012; PEREIRA, 2014, CORTEZ et al. 2017).

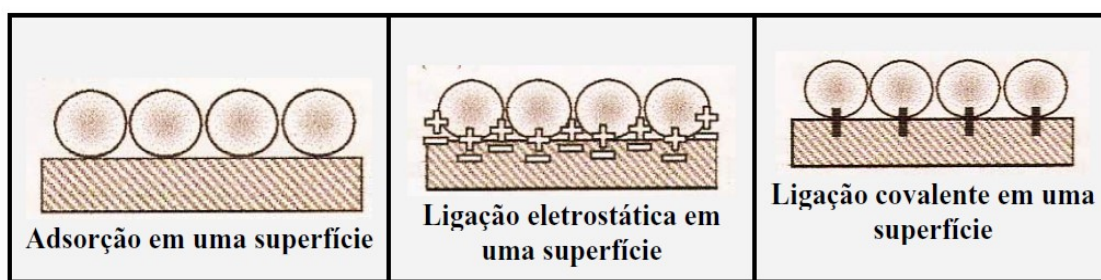
Na Figura 2 pode ser observado os tipos de ligação entre a célula e o suporte de imobilização.

A adsorção se dá pela ligação do microrganismo na superfície do suporte por ligações de baixa energia como Van der Waals ou hidrofóbicas, iônicas, etc. A adsorção tem como vantagem a facilidade da preparação e baixos custos, além de não envolver nenhum produto químico tóxico e o material imobilizado resultante não sofre limitações internas de transferência de massa (JEGANNATHAN et al., 2008; MENDES et al., 2011). No entanto, uma grande desvantagem desta técnica é possibilidade de sofrer dessorção devido às variações de temperatura, pH e força iônica deixando o material vulnerável podendo ser perdido para o meio reacional (KOSSEVA et al., 2009; PEREIRA, 2014).

Já a imobilização por meio de ligações covalentes resulta em uma interação de células-suporte mais forte e estável, tendo como principal desvantagem o risco de danos à membrana celular (CANILHA et al., 2006; ELIZEI, 2009).

Materiais celulósicos como serragem e madeira e materiais inorgânicos como vidro e porcelana são exemplos de superfícies utilizadas neste método de imobilização (KOURKOUTAS et al., 2004; MILESSI, 2012).

**Figura 2.** Tipos de ligação entre a célula e o suporte de imobilização.



Fonte: Adaptada de Kourkoutas et al. (2004).

### 3.1.2.2 Método de Encapsulação/Aprisionamento

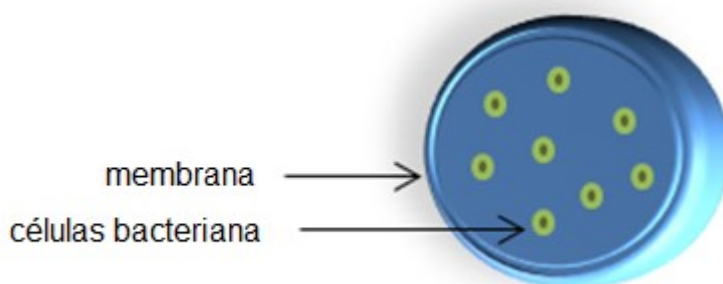
Segundo Zuidam e Nedovic (2009), citado por Nedovic et al. (2011) a encapsulação pode ser definida como um processo de aprisionamento de uma substância (agente ativo) em outra substância (material de parede). A substância encapsulada pode ser chamada de fase núcleo e a substância que está encapsulando é frequentemente chamada de revestimento, membrana, cápsula, material de suporte, fase externa ou matriz.

A técnica de encapsulação é largamente empregada nas áreas de alimentos, têxtil, agronomia, química e farmacêutica.

As cápsulas podem ser classificadas de acordo com seu tamanho em macrocápsulas, que são aquelas maiores que 5000  $\mu\text{m}$  e, microcápsulas, onde o tamanho varia entre 0,2 e 5000  $\mu\text{m}$ . Os fatores determinantes para o tamanho das cápsulas são basicamente o material de parede e a técnica utilizada para a encapsulação (CAVALHEIRO et al., 2015).

A imobilização por aprisionamento em membrana também conhecido por contecção em membranas, baseia-se na formação de uma membrana em torno das células, seja esta membrana pré-formada ou formada *in situ*. A grande desvantagem deste método é a limitação de transferência de massa e a ocorrência de bioincrustação na membrana devido ao crescimento celular (CANILHA, 2006). Na Figura 3 é apresentada a forma estrutural de uma cápsula formada.

**Figura 3.** Representação estrutural de uma cápsula com células microbianas aprisionadas



Fonte: Autoria própria.

Já o método de aprisionamento em matriz é baseado na difusão celular em uma matriz porosa, este pode ser pré-formada ou sintetizada *in situ* (CORTEZ et. al 2017).

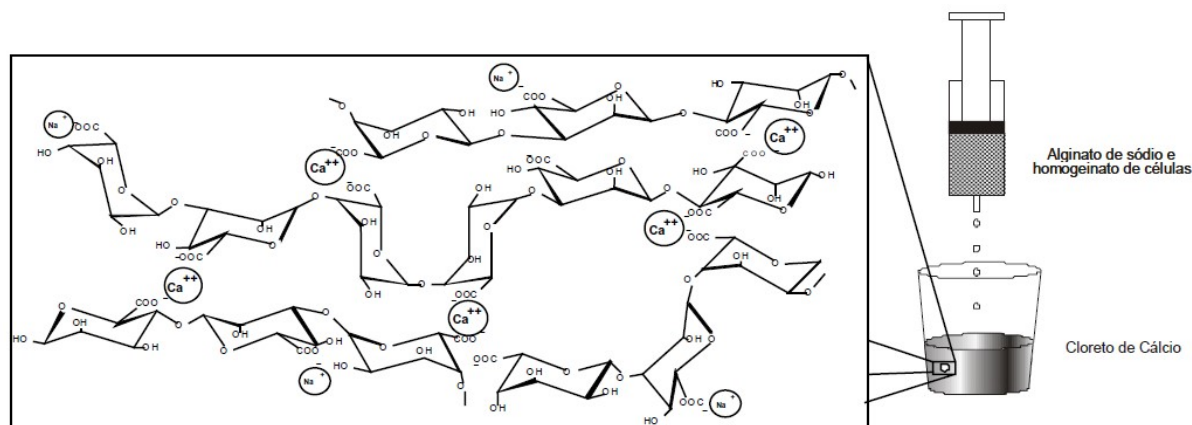
Ambos os casos são baseados na inclusão das células dentro de uma malha rígida que impede a difusão das células para o meio. Esse método vem sendo amplamente estudado na imobilização de células viáveis, pois preserva a integridade celular, uma vez que, permite o emprego de polímeros hidrofílicos biocompatíveis como suporte de imobilização. O encapsulamento de células em géis de polissacarídeos, como alginatos, ágar e quitosana são exemplos deste tipo de imobilização. O crescimento celular na matriz porosa depende das limitações de difusão impostas pela porosidade do material (KOURKOUTAS et al., 2004; CANILHA et al., 2006; COVIZZI et al., 2007).

O aprisionamento em gel pode ser feito pelo método de extrusão, que nada mais é do que produzir uma pequena gotícula da solução do material de encapsulamento forçada através de pequenas aberturas em dispositivos geradores de gotas. Quanto menor o diâmetro interno da abertura, menor o tamanho das esferas (VOS et al., 2010). O tamanho e a forma esférica das gotículas dependem, também, da distância entre o sistema de gotejamento e superfície da solução geleificante bem como da viscosidade da solução de alginato de sódio (ZIMMERMANN, 2001).

Segundo Nedovic et al. (2011) o método de imobilização que tem crescentes pesquisas na área de alimentos é o aprisionamento das células em gel de polímeros naturais como o alginato, sendo que esta técnica consiste em gotejar uma solução aquosa de polímero (com concentrações entre 0,6 e 3,0% m/m de alginato de sódio) contendo o ativo em um banho de geleificação. No caso do alginato, o banho de geleificação é a solução de cloreto de cálcio. A ferramenta de gotejamento pode ser simplesmente uma pipeta ou uma seringa, conforme está ilustrado na Figura 4.



**Figura 4.** O gotejamento do alginato de sódio em solução de cloreto de cálcio produz uma malha de textura gelatinosa de formato esférico através do mecanismo de gelificação iônica, onde ficam aprisionadas as células.



Fonte: Covizzi et al. (2007).

O método de aprisionamento através de gotas feitas com alginato e cálcio é extremamente popular e destaca-se como método promissor e versátil para a imobilização de células vivas. A principal vantagem dessa técnica é a simplicidade pela qual as partículas esféricas podem ser obtidas por gotejamento de uma suspensão contendo células e polímero em um meio que contém íons de precipitação (KOSSEVA et al., 2009).

Para o aprisionamento de células, estas devem ser dispersas na solução de alginato antes do gotejamento na solução de  $\text{CaCl}_2$ , neste caso o material imobilizado fica aprisionado entre as cadeias de alginato de cálcio (ZIMMERMANN, 2001).

A imobilização de células microbianas é uma alternativa para a condução de bioprocessos e a imobilização celular por aprisionamento em esferas tem recebido crescente atenção nos últimos anos. Um grande número de aplicações nas áreas da biotecnologia, alimentícia, agricultura, químicas, cosméticos e até mesmo na medicina tem sido verificada (CANILHA et al., 2006; BRETÓN, MUNGUÍA, 2008; VILELA et al., 2012; ELIZEI et al., 2014).

Existem inumeros trabalhos que estudam a encapsulação de microrganismos para as mais diversas finalidades. Oliveira (2014) estudou a encapsulação das microalgas *Chlorella* sp em alginato de cálcio para tratamento de águas residuais. Trabelsi et al. (2014), avaliaram a eficiência da imobilização em termos de viabilidade e atividade antibacteriana. Farbo et al. (2016) avaliaram a adsorção de

ocratoxina A do suco de uva por células de levedura imobilizadas em de alginato de cálcio.

Vários pesquisadores encapsularam diferentes microrganismos probióticos com a finalidade de melhorar a taxa de sobrevivência no ambiente gastrointestinal (SHINDE et al., 2014; HAGHSHENAS et al., 2015; GUL, DERVISOGLU, 2016).

### 3.2 SUPORTES UTILIZADOS PARA IMOBILIZAÇÃO

Mendes et al. (2011) salientam que na escolha do suporte para determinada aplicação devem ser consideradas suas propriedades físicas e químicas, sendo observadas a área superficial, insolubilidade, permeabilidade, capacidade de regeneração, composição, natureza (hidrofilica ou hidrofóbica), resistência e custo. Os suportes podem ser classificados conforme sua morfologia em materiais porosos, não porosos e de estrutura de gel.

Na literatura são descritos vários materiais que podem ser utilizados como suporte para imobilização. Esses materiais devem ser encontrados facilmente e em abundância, ter baixo custo, ser de fácil operação, não ser tóxico para a célula que se pretende aprisionar e ter alta resistência mecânica (MENDES, 2009).

Os suportes comumente utilizados para imobilização de células microbianas são de origem biológica como alginato, ágar, carragena entre outros ou sintéticos como é o caso da policrilamida e polivinil álcool (LIMA, 2011).

Dados da literatura científica mostram que o alginato de sódio é o bipolímero mais utilizado para a imobilização, sendo considerado um suporte eficiente principalmente para imobilização de células microbianas (COVIZZI et al., 2007; LIMA, 2011; TRABELSI et al., 2014).

O alginato é um polissacarídeo solúvel em água extraído de várias espécies de algas, sua estrutura consiste de cadeias lineares de ácido manurônico ligado por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$ , e também, por unidades de ácido gulurônico, unidas por ligações do tipo  $\alpha(1\rightarrow4)$  (GUO et al., 2006; MORETINI; MELO, 2007; ISLAM et al., 2010). Porém, os géis de alginato de cálcio são quimicamente instáveis na presença de alguns componentes do meio de cultivo, como íons fosfato

e citrato, podendo sofrer rupturas ou até mesmo dissolverem-se no meio (COVIZZI et al., 2007).

A imobilização em alginato é um método não tóxico aos microrganismos, permitindo que as células microbianas realizem seus processos biológicos sem desestabilizar a esfera (VILELA et al., 2012). O alginato é um polissacarídeo geleificante natural que quando está em contato com íons bivalentes como o cálcio, forma uma estrutura reticulada propícia à encapsulação de materiais sensíveis como as células bacterianas (KOSSEVA et al., 2009; OLIVEIRA, 2014).

O alginato de sódio em contato com cátions metálicos, como cálcio sofre geleificação e se mantém estável por longos períodos, por isso se mostra eficiente na imobilização de células microbianas (MORETINI; MELO, 2007; LIMA, 2011).

As esferas formadas no processo de geleificação podem ser conservadas em temperaturas entre 4 e 10 °C por um período de até 12 meses, sendo que a secagem é considerada o método mais eficiente para a conservação do gel formado. Essa secagem pode ser tanto em estufa ou em temperatura ambiente como por liofilização, sendo que o método de secagem influencia significativamente na porosidade do gel de alginato (ZIMMERMANN, 2001).

Cocoran (1985) citado por Canilha et al. (2006) diz que como a formação do gel ocorre rapidamente na presença de íons de cálcio, sem alterações drásticas de temperatura, pH e pressão osmótica, a atividade e viabilidade dos microrganismos imobilizados são conservadas.

### **3.3 ENTEROBACTÉRIAS**

As enterobacteriáceas ou enterobactérias são uma família de bacilos Gram-negativos, móveis por flagelação ou imóveis, não esporulantes, anaeróbios facultativos, que apresentam exigências nutricionais relativamente simples (CAMPOS; TRABULSI, 2002; MADIGAN et al., 2004). Podem ser encontradas amplamente distribuídas na natureza, entretanto a maioria habita o intestino do homem e dos animais seja compondo a microbiota normal ou como agente de infecção. A maioria das espécies desta família cresce bem a 37 °C, embora algumas espécies cresçam melhor entre 25 e 30 °C (MLAGA et al., 2017).

Taxonomicamente, a família *Enterobacteriaceae* tem até o momento 53 gêneros e mais de 170 espécies mencionadas. Destes, 26 gêneros são conhecidos por estarem associados a infecções em seres humanos (KHAN et al., 2011; MLAGA et al., 2017).

A diferenciação do gênero e espécies desta família pode ser realizada por meio de uma série de provas bioquímicas, sendo que algumas espécies em um mesmo gênero podem ser semelhantes sendo necessário um grande número de provas para diferenciá-las (KHAN et al., 2011).

A relação dos gêneros e espécies clássicas da família *Enterobacteriaceae* é apresentada na Tabela 1 e para fins de ilustração, na Tabela 2 são apresentados à diferenciação bioquímica dos principais gêneros utilizando número reduzido de provas (CAMPOS; TRABULSI, 2002).

**Tabela 1** - Principais gêneros e espécies da família *Enterobacteriaceae*

<b>Gêneros</b>	<b>Espécies</b>
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>
<i>Shigella</i>	<i>S. dysenteriae</i>
	<i>S. flexneri</i>
	<i>S. boydii</i>
	<i>S. sonnei</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i>
	<i>C. diversus</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i>
	<i>K. ozaenae</i>
	<i>K. rhinoscleromatis</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>E. aerogenes</i>
	<i>E. cloacae</i>
<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i>
	<i>S. liquefaciens</i>
<i>Proteus</i>	<i>P. vulgaris</i>
	<i>P. mirabilis</i>
<i>Yersinia</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
	<i>Y. pestis</i>
<i>Salmonella</i>	<i>S. entérica</i>
	<i>S. bongori</i>

Fonte: Adaptado de CAMPOS e TRABULSI (2002).

**Tabela 2-** Diferenciação bioquímica dos principais gêneros de *Enterobacteriaceae*

Testes bioquímicos	<i>Escherichia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Serratia</i>	<i>Proteus</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Salmonella</i>
Lactose	+	-	d	+	+	-	-	-	-
Gás (glicose)	+	-	+	+	+	+	+	-	+
H <sub>2</sub> S	-	-	d	-	-	-	d	-	+
Urease	-	-	d	+	d	d	+	+	-
L-TD <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Motilidade	d	-	+	-	+	+	+	d	+
Indol	+	d	d	-	-	-	d	d	-
Lisina	+	-	-	+	d	+	-	-	+
Citrato de Simmons	-	-	+	+	+	+	d	d	+

d = reação positiva (+) ou negativa (-)

a L-TD = L-triptofano-desaminase, reação positiva ou negativa

Fonte: Adaptado de CAMPOS E TRABULSI (2002).

Praticamente todos os membros da família das enterobactérias, salvo algumas exceções, demonstram capacidade de crescimento em meios como MacConkey, fermentam glicose, apresentam reação de catalase positiva e tem capacidade de reduzir nitrato a nitrito (KHAN et al., 2011).

As enterobactérias não são exigentes quanto aos meios de cultura para crescimento, podendo ser cultivadas em qualquer meio de uso geral. Todos os meios sólidos utilizados no isolamento de enterobactérias contêm um ou mais açúcares que quando metabolizados formam produtos capazes de acidificar o meio. A acidificação é detectada pela presença de um indicador de pH e, portanto, os meios de isolamento além de seletivos são diferenciais o que é importante para orientar na identificação do gênero (CAMPOS E TRABULSI, 2002).

### 3.3.1. *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* compreende as espécies *E. coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris*, porém a espécie de maior importância é a *Escherichia coli* (CAMPOS; TRABULSI, 2002).

Corrêa (2012) descreve que Theodor Von Escherich foi o primeiro a mencionar sobre a *Escherichia coli* em 1885, a qual foi primeiramente denominada de *Bacterim coli commune*. Somente no ano de 1958, recebeu sua denominação atual de *Escherichia coli*. Ferreira e Knöbl (2009) citado por Rocha (2012) relatam que durante muito tempo a *E. coli* foi considerada um microrganismo não patogênico, no entanto após seus sorotipos serem associados as doenças em animais e seres humanos esta caracterização foi modificada.

A *Escherichia coli* é um bastonete curto, Gram-negativo, não esporulado, que mede entre 1,1 a 1,5  $\mu\text{m}$  por 2 a 6  $\mu\text{m}$ , a maioria é móvel, devido a existência de flagelos peritríqueos, podendo também ser imóvel e ainda é anaeróbia facultativa. É uma bactéria de cultivo fácil, seu crescimento ocorre em temperaturas de 18 a 44 °C, sendo a temperatura ótima de crescimento por volta dos 37 °C (QUINN et al., 2005; APHA, 2015).

Esta bactéria caracteriza-se por apresentar metabolismo anaeróbio facultativo, pois possui metabolismo respiratório e fermentativo. É capaz de fermentar diferentes açúcares como, a lactose, glicose, maltose, manose, manitol, xilose, glicerol, ramanose, sorbitol e arabinose com produção de ácido e gás. A fermentação do adonitol, sacarose, salicina, rafinose, ornitina, dulcitol e arginina é variável (QUINN et al., 2005). As provas bioquímicas para diferenciação da espécie *Escherichia coli* estão apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3** - Diferenciação de espécie do gênero *Escherichia*

<b>Provas bioquímicas</b>	<b><i>E. coli</i></b>
Indol	+
Vermelho de metila	+
Voges-Proskauer	-
Citrato	-
Lisina descarboxilase	+
Arginina diidrolase	V (17)
Ornitina descarboxilase	V (65)
ONPG	+
Fermentação de:	
Lactose	+
Sorbitol	+ <sup>+</sup>
Manitol	+
Adonitol	-
Celobiose	-
Pigmento amarelo	-

+ : 90 % de cepas positivas; - : 90% ou mais de cepas negativas; V: 11%-89% de cepas positivas. <sup>+</sup>As cepas de *E. coli* pertencentes ao sorotipo O157H7 são sorbitol-negativas  
 Fonte: Adaptada de KONEMAN et al. (2001).

Em ágar MacConkey a *E. coli* produz colônias na cor rosa clara, enquanto em ágar-eosina-azul de metileno (EMB) produz colônias verde escuras com brilho metálico ou pretas. Podem também apresentar atividade hemolítica em ágar-sangue (QUINN et al., 2005; ROCHA 2012; APHA, 2015). Em meios nutrientes sólidos, as colônias apresentam cerca de 1 a 3 mm de diâmetro, podendo apresentar as formas lisas e rugosas (QUINN et al., 2005).

Esse microrganismo pertence tanto ao grupo dos coliformes totais quanto dos coliformes termotolerantes (coliformes a 45 °C). Sua presença em alimentos é considerada o mais específico indicador de contaminação fecal e eventual presença de outros microrganismos enteropatogênicos (FRANCO 2002; OLIVEIRA et al., 2004; APHA, 2015). Mesmo que seu habitat natural seja o trato intestinal de animais de sangue quente ela pode ser introduzida nos alimentos a partir de outras fontes não fecais (SILVA et al., 2007).

São frequentemente utilizadas como indicadores higiênico-sanitários no controle da qualidade de água e alimentos (OLIVEIRA et al., 2004). Muitos fatores influenciam na sua disseminação no meio ambiente, pois é excretada nas fezes e podem sobreviver nas partículas fecais, poeira e água por semanas ou meses, crescendo rapidamente, pois usa uma grande variedade de materiais como nutrientes (ANDRADE, 2005).

### 3.3.2. *Enterobacter aerogenes*

O gênero *Enterobacter* foi descrito pela primeira vez por Hormaeche e Edwards em 1960. Atualmente, existem 22 espécies no gênero *Enterobacter* podendo ser destacadas: *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloace*, *Enterobacter agglomemns*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter sakazakii* (PATERSON, 2006; MEZZATESTA et al., 2012).

As bactérias do gênero *Enterobacter* são anaeróbias facultativas, Gram-negativas, não formadora de esporos e com morfologia de bastonete. Tem dimensões entre 0,6 - 1,0  $\mu\text{m}$  por 1,2 - 3,0  $\mu\text{m}$ , são móveis por flagelos peritríquios (MEZZATESTA et al., 2012; TORTORA et al., 2012). Fazem fermentação fórmica e fermentação do butanodiol, produzindo pequenas quantidades de ácidos. Formam, predominantemente, como produtos finais compostos neutros como o etanol, acetoína e butanodiol (PATERSON, 2006).

A espécie *Enterobacter aerogenes* foi originalmente denominada *Aerobacter aerogenes* e em 1960 foi incluída no gênero *Enterobacter*. Em 1971, foi proposto a renomeação desta espécie para *Klebsiella mobilis*. Porém o gênero *Enterobacter* pode ser rapidamente diferenciado do gênero *Klebsiella*. *Enterobacter* são móveis, urease negativa e ornitina descaboxilase positiva. Além disso, são resistentes a cefalotina e cefoxitina enquanto que o gênero *Klebsiella* é susceptível a esses agentes (KONEMAN et al.; 2006; MEZZATESTA et al., 2012; REGLI; PAGÈS, 2015).

*Enterobacter aerogenes* é uma espécie amplamente distribuída na natureza, comumente encontrada em água doce, solo, esgotos, plantas, vegetais, animais, bem como no trato intestinal de animais de sangue quente (MADIGAN et al., 2004; SILVA et al., 2007).

Em humanos pode provocar uma grande variedade de doenças, dependendo de qual parte do corpo invade (PATERSON, 2006). O *Enterobacter aerogenes* é um coliforme termotolerante que pode contaminar alimentos (KONEMAN et al., 2006).

Em laboratório, o *E. aerogenes* cresce bem em ágar MacConkey, que contém corantes, sais e açúcares de leite, como a lactose. A sua temperatura ótima de crescimento varia de 30 a 37 °C (PATERSON, 2006). São fermentadores de glicose com produção de ácido e gás. Os sorotipos possuem em sua maioria reação positiva no teste Voges Proskauer e Citrato de Simmons, sendo negativos no teste Vermelho



de Metila e lisina positiva. As provas bioquímicas para identificação da *Enterobacter aerogenes* estão apresentadas na Tabela 4 (KONEMAN et al., 2001).

**Tabela 4** - Identificação bioquímica da *Enterobacter aerogenes*

<b>Provas bioquímicas</b>	<b><i>Enterobacter aerogenes</i></b>
Gás	++
Sulfeto de Hidrogenio (H <sub>2</sub> S)	-
Indol	-
Vermelho de metila	+
Voges-Proskauer	+
Citrato	+
Lisina descarboxilase	+
Arginina diidrolase	-
Ornitina descarboxilase	+
ONPG	+

++ reação fortemente positiva

Fonte: adaptada de KONEMAN et al. (2001).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

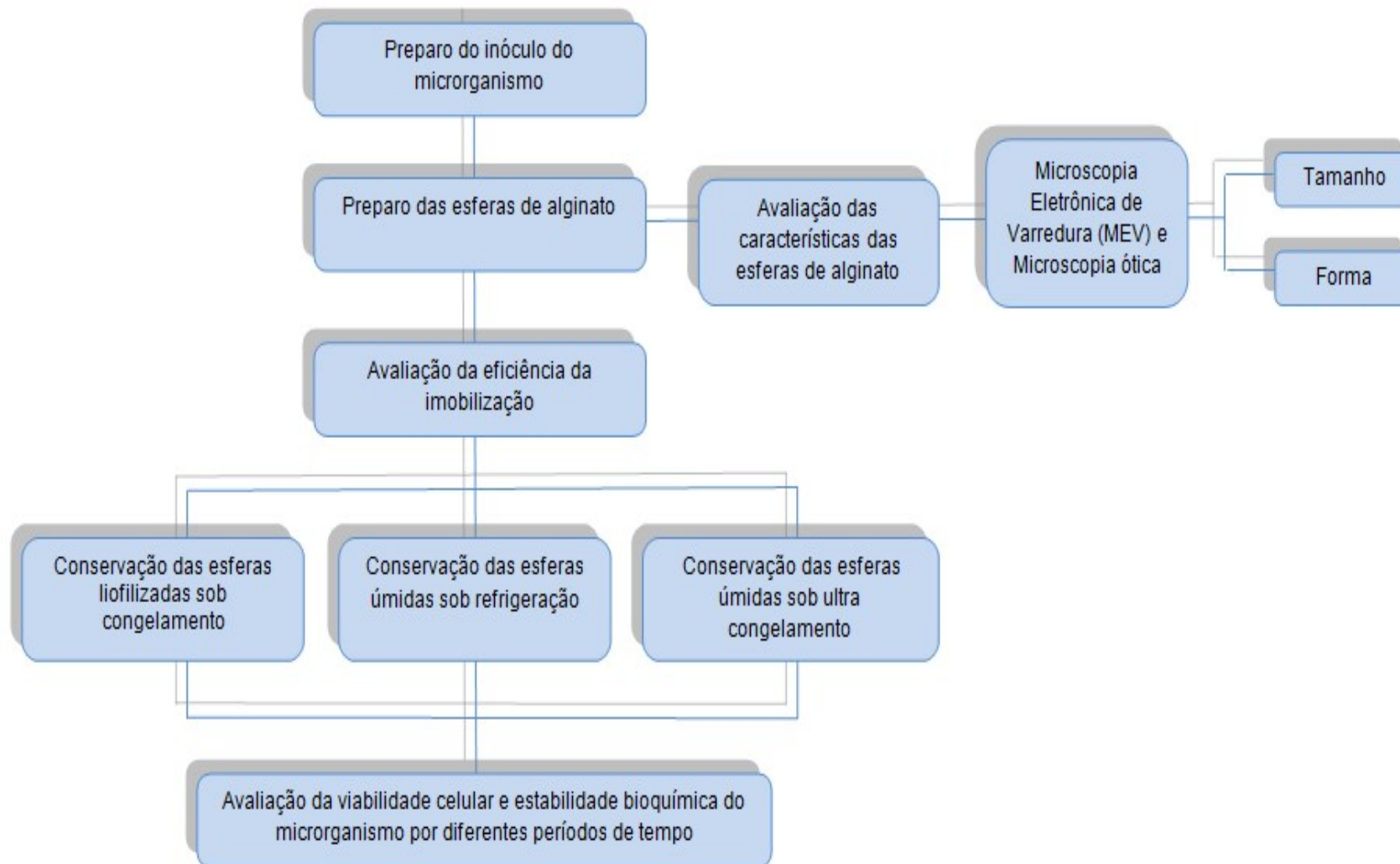
O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Microbiologia do SENAI Chapecó – SC e no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da UTFPR, Câmpus Pato Branco.

Foram adquiridos reagentes e meios de cultura com grau de pureza adequado as atividades experimentais. As cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 foram adquiridas da *Microbiologics*®. A escolha da ATCC é baseada no catálogo *World Data Centre for Microorganisms* – WDCM de cepas de referência para microbiologia alimentar e aquática.

## 4.2 MÉTODOS

O estudo da imobilização de *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes* em alginato de cálcio e a avaliação da viabilidade celular e comportamento bioquímico seguiram as etapas descritas no fluxograma apresentado na Figura 5.

**Figura 5.** Fluxograma das atividades para o estudo da imobilização de células microbianas em alginato de cálcio, caracterização da morfologia das esferas, avaliação da estabilidade bioquímica e da viabilidade celular para cada um dos microrganismos: *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*.



Fonte: Autoria própria.

#### 4.2.1 Preparo dos inóculos

Para o preparo do inóculo com *E. coli* e *E. aerogenes* foi empregado o meio de cultivo Luria Bertani (LB). Este é um meio rico e largamente utilizado, bastante popular entre os bacteriologistas porque permite um crescimento rápido e bons rendimentos para muitas espécies, incluído a *Escherichia coli* (SEZONOV et al., 2007). Este tipo de meio proporciona maior velocidade de crescimento devido a presença de triptona, que supre as bactérias com aminoácidos e peptídeos enquanto que o extrato de levedura supre a demanda por nitrogênio, nutrientes orgânicos e inorgânicos (BROWN, 2003; HUBÁLEK, 2003).

O meio LB foi preparado conforme Jin et al. (2016), utilizando Triptona (1% m/v), Extrato de levedura (0,5% m/v), Cloreto de sódio (1% m/v) e água destilada. O pH do meio foi ajustado para 7,0 e após foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

Inicialmente células de uma cultura estoque de cada microrganismo (*E. coli* ATCC 25922 e *E. aerogenes* ATCC 13048) foram transferidas para frasco Erlenmeyer contendo 250 mL do meio LB e cultivadas por 18 horas a 37 °C (KIMURA et al., 2017) com o objetivo de reativar as células. As células foram recuperadas por centrifugação (1500 x g, 15 min.), transferidas para frasco contendo 250 mL do meio LB e novamente cultivadas por 18 horas a 37 °C. O segundo cultivo foi realizado visando a obtenção de células jovens e viáveis.

Após o segundo cultivo e centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram re-suspendidas em solução salina estéril até que atingisse turvação semelhante à escala de MacFarland 0,5 a olho nu, de modo a obter-se um inóculo com concentração da ordem de 10<sup>8</sup> UFC (McFARLAND STANDARD, 2014).

#### 4.2.2 Preparo das esferas de alginato de sódio

As células em concentração pré-estabelecida (2 mL), conforme descrito no item 4.2.1, foram adicionadas em 500 mL do meio LB contendo 2% (m/v) de alginato de sódio, previamente preparado e esterilizado, e incubadas a 37 °C por 2 horas,

então esta mistura foi gotejada, por meio do uso de bomba peristáltica (Tecnal TE-BP-01-MINI), mangueira de silicone com 3 mm de diâmetro interno e agulha de escalpe de 23G, em solução de cloreto de cálcio ( $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ) também esterilizada (Figura 6).

As esferas produzidas permaneceram na solução de cloreto de cálcio durante aproximadamente 15 horas sob refrigeração em temperatura de  $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  para a maturação, garantindo a geleificação no interior das esferas. Após esta etapa as esferas foram lavadas com água destilada esterilizada a fim de retirar o excesso de cloreto de cálcio.

Todo o processo de imobilização dos microrganismos foi realizado sob condições assépticas em cabine de fluxo laminar (Logen Scientific).

Em seguida, o diâmetro médio de 20 esferas foi medido com auxílio de paquímetro objetivando avaliar a uniformidade do diâmetro das esferas.

Testes preliminares foram realizados para definir as concentrações das soluções de alginato de sódio e cloreto de cálcio e também para definir a melhor condição de gotejamento no que se refere à velocidade e altura.

A altura da ponteira em relação a superfície da solução de cloreto de cálcio foi de aproximadamente 25 cm e a velocidade programada da bomba peristáltica foi de 20 rpm ( $20 \text{ mL min}^{-1}$ ), definidas após várias tentativas, de modo a se obter partículas esféricas.

As esferas produzidas foram segregadas e armazenadas conforme Tabela 5:

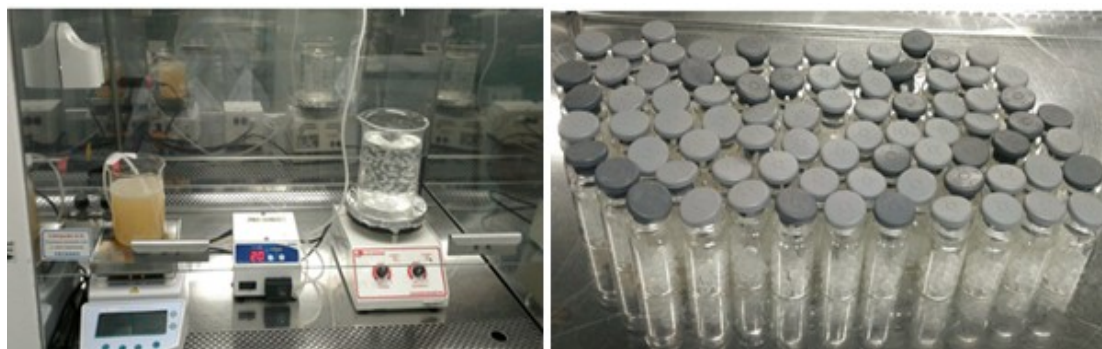
**Tabela 5** - Armazenamento das esferas.

<b>Esferas úmidas Refrigeradas</b> ( $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ )	<i>E. coli</i> ( <i>E.cUR</i> )
	<i>E. aerogenes</i> ( <i>E.aUR</i> )
<b>Esferas úmidas ultra Congeladas</b> (ultrafreezer INDREL IULT 335D a $-60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ )	<i>E. coli</i> ( <i>E.cUC</i> )
	<i>E. aerogenes</i> ( <i>E.aUC</i> )
<b>Esferas liofilizadas</b> (Thermo Electron Modulyod 115) Congeladas ( $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ )	<i>E. coli</i> ( <i>E.cLC</i> )
	<i>E. aerogenes</i> ( <i>E.aLC</i> )

Fonte: Autoria própria.

As esferas liofilizadas contendo *E. coli* e *E. aerogenes* foram estocadas em freezer ( $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), em frascos vedados sob vácuo.

**Figura 6.** Preparo das esferas de alginato



Fonte: Autoria própria

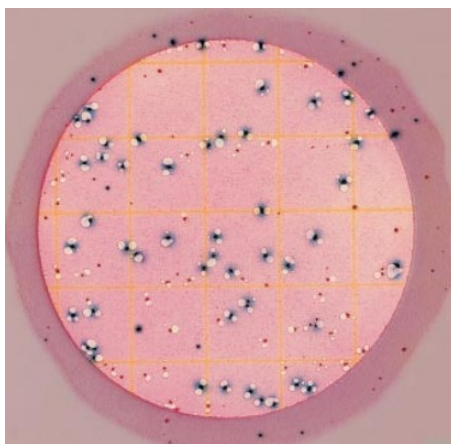
#### **4.2.3** Contagem de *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes* pela técnica de Petrifilm™

Um dos métodos alternativos para contagem de microrganismos em alimentos é o sistema Petrifilm™ (3M Company, St. Paul, MN, EUA). A placa de Petrifilm™ é um sistema de revestimento considerado “all-in-one” onde os ingredientes variam de placa para placa, dependendo do microrganismo cultivado.

A placa é constituída por um sistema de filme duplo. A base do cartão é revestida de polietileno recoberta com meio de cultura desidratado, que contém nutrientes e um agente gelificante solúvel em água fria. O filme superior é transparente, removível e contém um corante indicador (JASSON et al., 2010).

Para contagem de *Escherichia coli* seguiu-se o método 998.08 da AOAC (2012). As Placas 3M™Petrifilm™ para Contagem de *E. coli* e Coliformes (EC) contém nutrientes do meio Vermelho Violeta Bile (VRB), um agente geleificante solúvel em água fria, um indicador de atividade glucuronidásica e um indicador que facilita a enumeração da colônia. A maioria das cepas de *E. coli* (cerca de 97%) produz beta-glucuronidase formando um precipitado azul associado a colônia. O filme superior da placa retém o gás formado pelos coliformes e *E. coli* que são fermentadores de lactose. Cerca de 95% das *E. coli* produzem gás indicadas pelas colônias azuis a vermelho-azuladas associadas ao gás retido na Placa Petrifilm EC (3M do Brasil, 2009). Na Figura 7 é ilustrada uma placa de Petrifilm para contagem de *E. coli* e Coliformes.

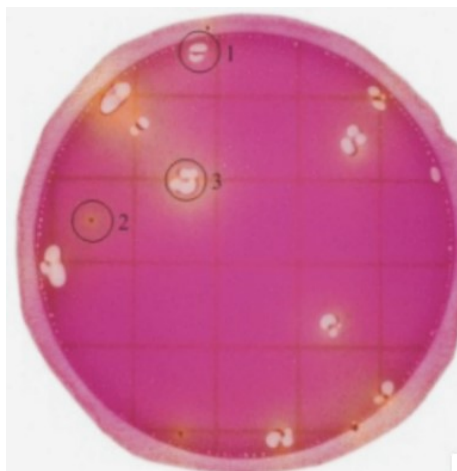
**Figura 7.** Contagem de *E. coli* = 49 colônias azuis com gás; Contagem de Coliformes Totais = 87 colônias vermelhas e azuis com gás



Fonte: 3M Company, St. Paul, MN, EUA

Para contagem de *Enterobacter aerogenes* seguiu-se o método 2003.01 da AOAC (2012). As Placas Petrifilm™ para Contagem de *Enterobacteriaceae* (EB) contêm nutrientes modificados de Vermelho Violeta Bile Glicose (VRBG), um agente geleificante solúvel em água fria e um indicador de tetrazólio que facilita a enumeração das colônias bacterianas. As colônias características se mostram vermelhas. O filme superficial da placa prende o gás produzido por algumas bactérias e as bactérias produtoras de ácido são visualizadas como colônias vermelhas circundadas por zonas amarelas. As bolhas de gás podem ter padrões variados. Com o aumento da contagem de microrganismos a cor do gel pode variar de púrpura a amarelo ou creme (3M do Brasil, 2009). Na Figura 8 é ilustrada uma placa para contagem de *Enterobacteriaceae* (EB).

**Figura 8.** Contagem de *Enterobacteriaceae* = 13



Círculo 1: colônias associadas com bolhas de gás e nenhuma zona ácida.

Círculo 2: colônias com zonas ácidas amarelas sem produção de gás.

Círculo 3: colônias produzindo gás e ácido.

Fonte: 3M Company, St. Paul, MN, EUA

Para determinação da contagem de *E. coli* e *E. aerogenes* immobilizadas nas esferas de alginato de cálcio, foi realizada a dissolução de 1 grama de esferas em solução de citrato de sódio  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ , e após a realização da série de diluições foi realizado o plaqueamento dispensando 1 mL de cada diluição no centro do filme inferior, cuidando para que cada diluição coincidissem com a Petrifilm identificada. O plaqueamento foi realizado em triplicata para cada diluição realizada. Em seguida, as placas para contagem de *E. coli* foram incubadas em estufa a  $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  por  $24 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$  (AOAC, Official Method 998.08:2012) e as placas para a contagem de *E. aerogenes* foram incubadas em estufa a  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  por  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  (AOAC, Official Method of Analysis 2003.01:2012). Após o período de incubação as colônias crescidas nas placas de Petrifilm foram contadas. As médias dos resultados foram convertidas em logaritmo e os resultados expressos em unidades formadoras de colônias por grama ( $\log \text{ UFC g}^{-1}$ ).



#### 4.2.4 Identificação bacteriana pelo método de análise bioquímica automatizada (VITEK 2)

O sistema VITEK 2 (Figura 9) permite, com base no perfil bioquímico e atividade metabólica, identificar espécies de bactérias a partir de colônias puras com rapidez e acurácia. Este equipamento se baseia, para identificação das colônias, no seu banco de dados de diferentes bactérias. O sistema realiza uma análise cinética da cultura inoculada com leituras a cada 15 minutos (FRAZÃO, 2014; MONTEIRO, 2016).

O equipamento trabalha com cartões para identificação chamados de Reagent Card, sendo que cada cartão contém 64 poços com substratos individuais capazes de analisar diferentes atividades metabólicas, como: acidez, basicidade, hidrólise e crescimento ou não na presença de inibidores. A identificação de cada amostra leva em torno de oito horas. O resultado se refere a probabilidade de a identificação ser igual ao dos padrões daquela espécie bacteriana, sendo que uma correspondência perfeita entre o padrão e o determinado microrganismo em questão daria uma porcentagem de probabilidade de 99%. A carta de identificação classifica como excelente uma porcentagem de probabilidade de 86 a 99% (FUNKE, 1998; FRAZÃO, 2014; MONTEIRO, 2016).

Os cartões são produzidos para séries específicas de microrganismos: bacilos Gram-negativos (GN card), cocos Gram-positivos (GP card), leveduras (YST card) e bactérias anaeróbias (ANC card). Assim, esse sistema permite a identificação de mais de 330 espécies de microrganismos (MONTEIRO, 2016).

**Figura 9.** Vitek 2



Fonte: Biomerieux disponível em <http://www.biomerieux-usa.com/industry/vitek-2-product-safety?dest=view>

As provas bioquímicas para a *E. coli* e *E. aerogenes* após a imobilização e no final do período de 240 dias, foram realizadas a partir das colônias bacterianas crescidas nas placas de Petrifilm, que foram transferidas para placas de ágar sangue e incubadas a 37 °C por 24 h. As colônias desenvolvidas no meio ágar sangue foram suspensas em solução fisiológica 0,45 g L<sup>-1</sup> com objetivo de obter uma concentração celular correspondente ao padrão 0,5 de MacFarland. Esta suspensão padronizada foi introduzida no console do VITEK 2 a fim de obter a identificação do micorganismo.

O cartão utilizado para avaliação do perfil bioquímico da *E. coli* e *E. aerogenes* foi o GN, que se baseia em métodos bioquímicos estabelecidos e em substratos que medem a utilização da fonte de carbono, atividade enzimática e resistência (SONY; POTTY, 2017). Os substratos analisados no cartão GN estão descritos na Tabela 6. O relatório das identificações foi gerado através da versão 7.01 do software do VITEK 2.

**Tabela 6 – Substratos do cartão GN.**

<b>Teste</b>	<b>Sigla</b>
Ala-Fe-Pro-Arilaminase	APPA
ADONITOL	ADO
L-Pirrolidonil-ARILAMINASE	PyrA
L-ARABITOL	IARL
D-CELABIOSE	dCEL
BETA-GALACTOSIDASE	BGAL
PRODUÇÃO DE H <sub>2</sub> S	H <sub>2</sub> S
BETA-N-ACETIL-GLUCOSAMINIDASE	BNAG
Glutamil Arilamidase pNA	AGLTp
D-GLUCOSE	dGLU
GAMA-GLUTAMIL-TRANSFERASE	GGT
FERMENTAÇÃO/GLUCOSE	OFF
BETA-GLUCOSIDASE	BGLU
D-MALTOSE	dMAL
D-MANITOL	dMAN
D-MANOSE	dMNE
BETA-XILOSIDASE	BXYL
BETA-Alanina arilamidase pNA	BAlap
L-Prolina ARILAMIDASE	ProA
OilIPASE	LIP
PALATINOSE	PLE
Tirosina ARILAMIDASE	TyrA
UREASE	URE
D-SORBITOL	dSOR
SACAROSE/SUCROSE	SAC
D-TAGATOSE	dTAG

---

D-TREALOSE	dTRE
CITRATO (SÓDIO)	CIT
MALONATO	MNT
5-CETO-D-GLUCONATO	5KG
Alcalinização L-LACTATO	ILATk
ALFA-GLUCOSIDASE	AGLU
Alcalinização SUCINATO	SUCT
Beta-N-ACETIL-GALACTOSAMINIDASE	NAGA
ALFA-GALACTOSIDASE	AGAL
FOSFATASE	PHOS
Glicina ARILAMIDASE	GlyA
ORNITINA DESCARBOXILASE	ODC
LISINA DESCARBOXILASE	LDC
Assimilação L-HISTIDINA	IHISa
CUMARATO	CMT
BETA-GLUCURONIDASE	BGUR
RESISTENCIA O/129 (comp. Vibrio.)	O129R
Glu-Gli-Arg-ARILAMIDASE	GGAA
Assimilação L-MALATO	IMLTa
ELLMAN	ELLM
Assimilação L-LACTATO	ILATa

---

Fonte: Adaptada de bioMérieux (2010).

#### 4.2.5 Avaliação da eficiência da imobilização

A eficiência da imobilização (% EI) foi calculada através da equação 1, para cada um dos microrganismos, *E. coli* e *E. aerogenes*:

$$EI \% = (\text{Log}_{10}N/\text{Log}_{10}N_0) \times 100 \quad (1)$$

Onde, N é contagem de células retidas nas esferas e  $N_0$  é a contagem de células livres antes do aprisionamento (células adicionadas à solução de LB contendo 2% de alginato de sódio) (LOTFIPOUR et al., 2012).

A contagem das células livres ( $N_0$ ) foi realizada por meio da técnica de contagem de bactérias em Placa Petrifilm™, conforme descrito no item 4.2.3 após a diluição de 1 mL do meio em 10 mL de citrato de sódio 0,3 mol L<sup>-1</sup> e posteriores diluições seriadas. A contagem de células retidas nas esferas (N) seguiu a técnica descrita no item 4.2.3, após a dissolução de 1 grama de esferas em solução de citrato de sódio 0,3 mol L<sup>-1</sup>. Todas as contagens foram realizadas em triplicata com

resultados convertidos em logaritmo (Log) e expressas em unidades formadoras de colônias por grama (log UFC g<sup>-1</sup>).

A fim de confirmar a eficiência da imobilização também foi realizado a contagem de células suspensas na solução de cloreto de cálcio utilizando a mesma técnica de contagem descrita no item 4.2.3, após a diluição de 1 mL da solução de cloreto de cálcio (0,2 mol L<sup>-1</sup>) em 10 mL de citrato de sódio (0,3 mol L<sup>-1</sup>).

#### **4.2.6** Avaliação da viabilidade celular e comportamento bioquímico dos microrganismos

A avaliação da viabilidade das cepas de *E. coli* e *E. aerogenes*, imobilizadas em esferas de alginato foi realizada por meio da técnica de contagem de bactérias em Placa Petrifilm™ descrita no item 4.2.3.

A viabilidade celular foi avaliada logo após a imobilização e no decorrer de 240 dias, sendo realizada mensalmente a contagem microbiana das esferas armazenadas conforme descrito na Tabela 5.

As esferas mantidas nas condições de armazenamento também foram avaliadas mensalmente quanto ao tamanho pela medição do seu diâmetro, em mm, através da utilização de paquímetro.

O comportamento bioquímico dos microrganismos imobilizados foi avaliado através da técnica de identificação de microrganismos, utilizando o equipamento VITEK® 2, conforme descrito no item 4.2.4. O objetivo foi avaliar o perfil bioquímico e investigar possíveis mutações após o processo de imobilização e ao final do período de 240 dias.

#### **4.2.7** Determinação do diâmetro e morfologia das esferas

O diâmetro das esferas produzidas foi acompanhado com o objetivo de avaliar a estabilidade do suporte de imobilização nas diferentes condições de armazenamento. A avaliação do diâmetro das esferas foi realizada logo após o processo de imobilização (tempo 0) e a cada 30 dias no decorrer dos 240 dias de

armazenamento. Para isso, uma amostragem aleatória de 20 esferas teve seu diâmetro medido, utilizando-se um paquímetro de precisão de 0,05 mm e a média dos valores foi expressada em mm.

Após o processo de imobilização foi avaliado a morfologia das esferas de alginato de cálcio por meio por meio da Microscopia Ótica (Nikon H550S) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Modelo: Hitachi TM3000).

#### **4.2.8 Análises estatísticas**

A avaliação estatística dos resultados obtidos nas contagens de *E. coli* e *E. aerogenes* foi realizada por meio do *Software* Past 3, através da análise de variância (ANOVA) e do teste de Tukey para comparação de médias ao nível de 5% de significância.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 PREPARO DAS ESFERAS DE ALGINATO DE SÓDIO**

Nos ensaios realizados durante a execução do experimento foram avaliadas diferentes concentrações de alginato de sódio (1, 2 e 3% p/v) e cloreto de cálcio como solução de geleificação (0,2, 0,3 e 0,4 mol L<sup>-1</sup>). Seguindo a metodologia proposta por Teixeira et al. (2014), com algumas modificações, verificou-se visualmente que a concentração de 1% de alginato não produzia esferas uniformes, que segundo CHANDRAMOULI et al., (2004) se deve a baixa viscosidade e presença de íons para reticulação. Já a concentração de 3% tinha viscosidade muito alta para o sistema de extrusão adotado. Portanto a concentração de 2% foi selecionada. Para a concentração de CaCl<sub>2</sub>, não foi observado diferenças na formação das esferas, portanto foi selecionado a concentração de 0,2 mol L<sup>-1</sup>, sendo esta também utilizada por Milessi (2012), Santos (2013) e Gul e Dervisoglu (2016).

## 5.2 EFICIÊNCIA DA IMOBILIZAÇÃO

A contagem de *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes* antes da imobilização e após a dissolução das esferas na solução de citrato de sódio  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  foi utilizada para calcular a eficiência da imobilização. Na Tabela 7 são apresentadas as médias e desvio padrão dos resultados de N,  $N_0$  e a eficiência da encapsulação para os dois microrganismos.

**Tabela 7** - Resultados de eficiência de imobilização para *E. coli* e *E. aerogenes*

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<b>N (LOG)</b>	8,35 ± 0,16	8,87 ± 0,04
<b><math>N_0</math> (LOG)</b>	8,42 ± 0,09	8,84 ± 0,10
<b>% EI</b>	99,15	99,62

Fonte: Dados da pesquisa.

N: Contagem de células retidas nas esferas.

$N_0$ : Contagem de células livres antes do aprisionamento (células adicionadas a solução de LB contendo 2% de alginato de sódio).

% EI: Eficiência da Imobilização.

Os resultados indicaram sucesso no método de imobilização utilizando a técnica de extrusão para a encapsulação por meio do aprisionamento de células em alginato (% EI > 99%) para os dois microrganismos avaliados, ou seja, alta capacidade da matriz em alojar a maior quantidade de células viáveis possível.

A eficiência obtida neste trabalho foi semelhante ao obtido por Silva (2018) e melhor que os resultados obtidos por Lotfipour et al. (2012) e Gul e Dervisoglu (2016). Estes autores relataram que obtiveram sucesso (%EI > 95%) na imobilização em esferas (em torno de 2 mm) de alginato de cálcio (2%) pela técnica de extrusão.

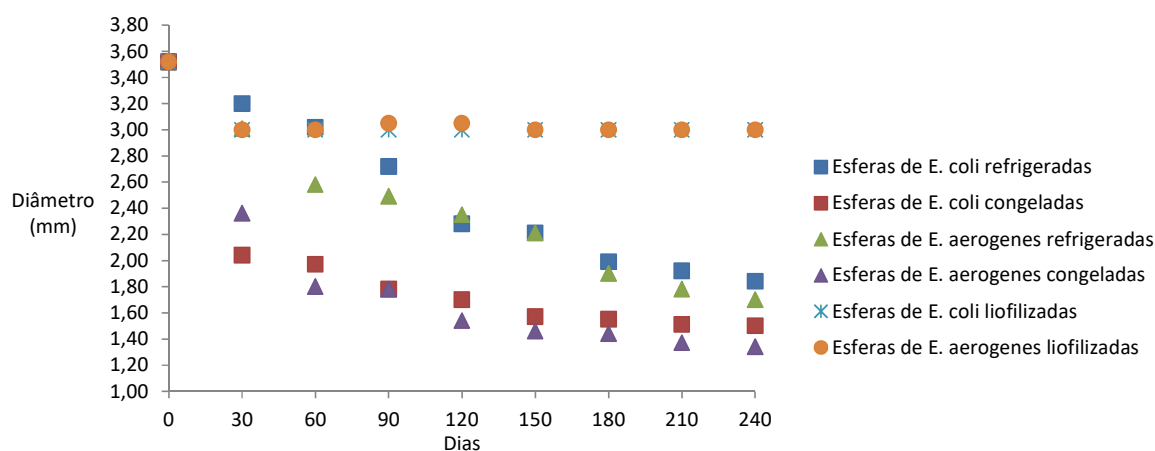
Segundo Chandramouli et al. (2004) a eficiência da encapsulação não depende exclusivamente do método aplicado, mas também, da concentração do alginato, do tamanho da cápsula, da concentração inicial de microrganismos e do tempo de cura.

Lotfipour et al. (2012) afirmam que a técnica de extrusão é mais suave, quando comparada com métodos de secagem por pulverização, garantindo sucesso no aprisionamento de microrganismos. Sobre o tamanho da cápsula, estes autores alegam que a concentração de alginato na solução é responsável pelo aumento das esferas obtidas e que com uma camada protetora maior há como consequência um aumento de microrganismos aprisionados na rede de alginato.

### 5.3 TAMANHO E MORFOLOGIA DAS ESFERAS

O diâmetro médio das 20 esferas, avaliadas logo após o processo de imobilização (tempo 0) e no decorrer dos 240 dias para as esferas armazenadas na forma úmida congeladas e refrigeradas e na forma liofilizada congeladas, são apresentados na Figura 10, para *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*.

**Figura 10.** Diâmetro médio das esferas e *E. coli* e *E. aerogenes*



Fonte: Autoria própria

Com a adoção do protocolo proposto para produção e obtenção das esferas contendo *E. coli* e *E. aerogenes* encapsuladas, controlados pelo dispositivo de gotejamento do meio LB contendo 2% (m/v) de alginato de sódio adicionado da cultura bacteriana, foi possível observar a formação de esferas padronizadas que tiveram a mesma distribuição de tamanho após o processo de imobilização, com diâmetro médio, obtido de 20 esferas, de  $3,52 \text{ mm} \pm 0,02$ . Diâmetro médio semelhante foi obtido por Sevda e Rodrigues (2014), avaliados após o processo de imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae*. Kawaguti et al. (2006), também obtiveram esferas com tamanho de 3 mm quando imobilizaram *Erwinia* sp. em alginato 2 % (m/v).

A variação dos diâmetros do tempo zero de armazenamento e do tempo de 240 dias de avaliação, para cada uma das formas de armazenamento, pode ser verificada na Tabela 8.

**Tabela 8** - Diâmetro médio e desvio padrão (mm) das esferas durante o período de armazenamento.

Dias	<i>E.cUR</i>	<i>E.cUC</i>	<i>E.aUR</i>	<i>E.aUC</i>	<i>E.cLC*</i>	<i>E.aLC*</i>
0	3,52 ± 0,02	3,52 ± 0,02	3,52 ± 0,02	3,52 ± 0,02	3,04 <sup>a</sup> ± 0,02	3,03 <sup>a</sup> ± 0,03
240	1,84 ± 0,06	1,50 ± 0,06	1,70 ± 0,08	1,34 ± 0,05	3,03 <sup>a</sup> ± 0,03	3,02 <sup>a</sup> ± 0,03

Fonte: Dados da pesquisa.

\* Diâmetros médios e desvio padrão (mm) após o processo de liofilização.

Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente na coluna (Tukey  $p < 0,05$ ).

*E.cUR*: esferas de *E. coli* úmida refrigerada; *E.cUC*: esferas de *E. coli* úmida ultracongelada; *E.cLC*: esferas de *E. coli* liofilizada congelada; *E.aUR*: esferas de *E. aerogenes* úmida refrigerada; *E.aUC*: esferas de *E. aerogenes* úmida ultracongelada; *E.aLC*: esferas de *E. aerogenes* liofilizada congelada.

Foi observado que durante o período de 240 dias de armazenamento as esferas tiveram seu diâmetro reduzido, com exceção das esferas liofilizadas que após o processo de liofilização não tiveram redução significativa ( $p > 0,05$ ) de tamanho ao longo do período de armazenamento. Os diâmetros, para as esferas liofilizadas congeladas, variaram de 3,00 mm a 3,05 mm tanto para *E. coli* quanto para *E. aerogenes*, mantendo o mesmo aspecto morfológico ao longo do período de avaliação.

A redução no tamanho médio de 3,52 mm antes da liofilização para aproximadamente 3,00 mm após o processo de liofilização é esperado e ocorre devido à remoção de água que acontece durante o processo de secagem por liofilização. A remoção de água além de promover o encolhimento do material pode provocar alterações na sua estrutura como o aumento no tamanho dos poros (NAKAGAWA et al., 2004; VARGAS, 2017).

Para as esferas conservadas úmidas percebeu-se uma queda acentuada de tamanho durante todo o período avaliado de 240 dias. Porém as maiores reduções foram observadas para as esferas ultracongeladas de *E. coli* e *E. aerogenes* com encolhimento de 57 e 62%, respectivamente, enquanto que as esferas mantidas sob refrigeração apresentaram menor redução, sendo 48 e 51% para as esferas de *E. coli* e *E. aerogenes*, respectivamente.

A explicação para redução do tamanho das esferas úmidas pode ser o efeito denominado sinerese. Helgerud et al. (2010) relatam que esse efeito é bastante comum em géis e acontece porque, no processo de geleificação, as moléculas de água são aprisionadas na rede de gel de alginato por ligações de hidrogênio. Porém,



ainda tem capacidade de migrar por difusão, uma vez que se pressionar a rede de gel algumas moléculas de água serão expulsas da rede.

Esses resultados evidenciam uma influência das condições de armazenamento demonstrando que a temperatura de ultracongelamento pode favorecer a migração das moléculas de água para o meio. Contudo, o encolhimento das esferas úmidas não influenciou, visualmente, na esfericidade das partículas.

As Figuras 11 e 12 representam a estrutura das esferas de alginato cálcio contendo *E. coli* e *E. aerogenes* na forma liofilizada e úmida que foram examinadas por meio da microscopia ótica.

As esferas úmidas foram avaliadas logo após o processo de imobilização para assegurar o formato. Estas tinham formato esférico com característica espessa e apresentaram pequenas irregularidades na superfície, característica também observada por Bernucci et al. (2017) durante a imobilização de *Bifidobacterium longum* 5<sup>1A</sup>.

Já as esferas liofilizadas apresentaram característica mais enrugada e com sulcos bem definidos, indicando a perda de água que é a consequência do processo de secagem. Zimmermann (2001) relata que a formação desses sulcos pode ser originária da secagem do alginato.

Durante o processo de secagem por liofilização há a formação de cristais de gelo, devido à temperatura baixa que as esferas de géis de polissacarídeos são submetidas, a sublimação desses cristais sob pressão reduzida forma um produto seco poroso, semelhante a uma esponja (DOLLY et al., 2011; ETCHEPARE, 2014).

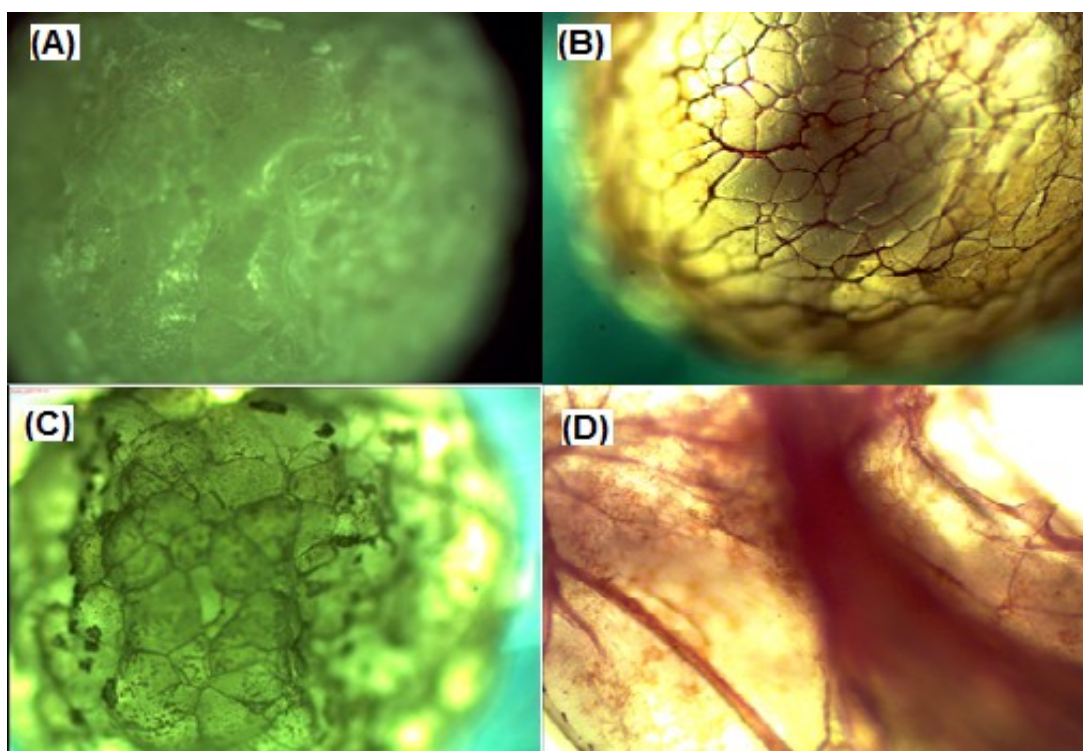
A microscopia eletrônica de varredura para as esferas úmidas confirmou as características de esfera densa com superfície irregular observada na microscopia ótica, conforme observado na Figura 13. Para as esferas liofilizadas, a morfologia por MEV permitiu visualizar as células dos microrganismos aglomeradas entre os poros, tornando presumível o aprisionamento do microrganismo na matriz, conforme demonstrado na Figura 14.

Santos et al. (2005) durante estudos para a caracterização de microcápsulas perceberam que a eficiência da microencapsulação como barreira pode ser afetada devido a presença de poros e fendas, mas que este problema pode ser solucionado através da aplicação de uma camada externa sobre a matriz de aprisionamento.

LAURENTI e GARCIA (2013) observaram, por meio do MEV, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* aprisionadas no meio encapsulante em um sistema de

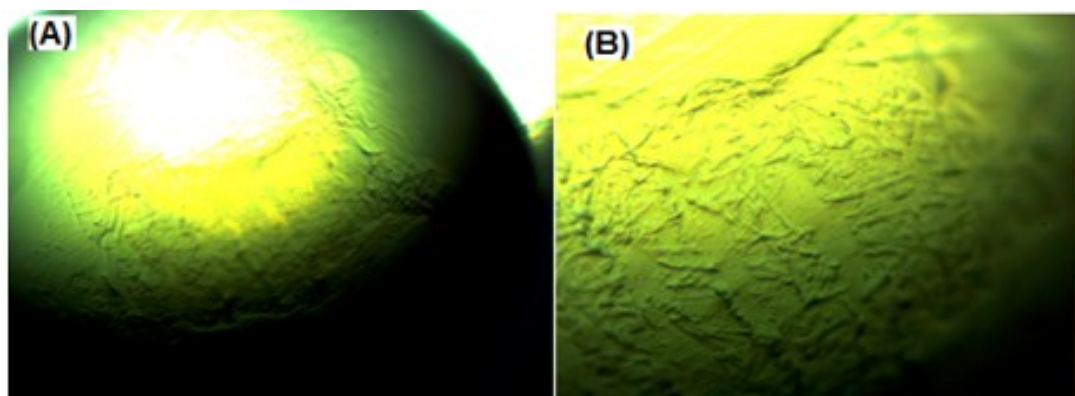
“colmeias” e células de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus johnsonii* foram observadas imobilizadas em microesferas de hidrogel de alginato por Tiani et al. (2017) por meio da microscopia eletrônica de varredura.

**Figura 11.** Microscopia Ótica das esferas liofilizadas (A) aumento de 40 X e contraste C, (B) aumento de 40 X e contraste PH2, (C) aumento de 100 X e contraste C, (D) aumento de 200 X e contraste PH2



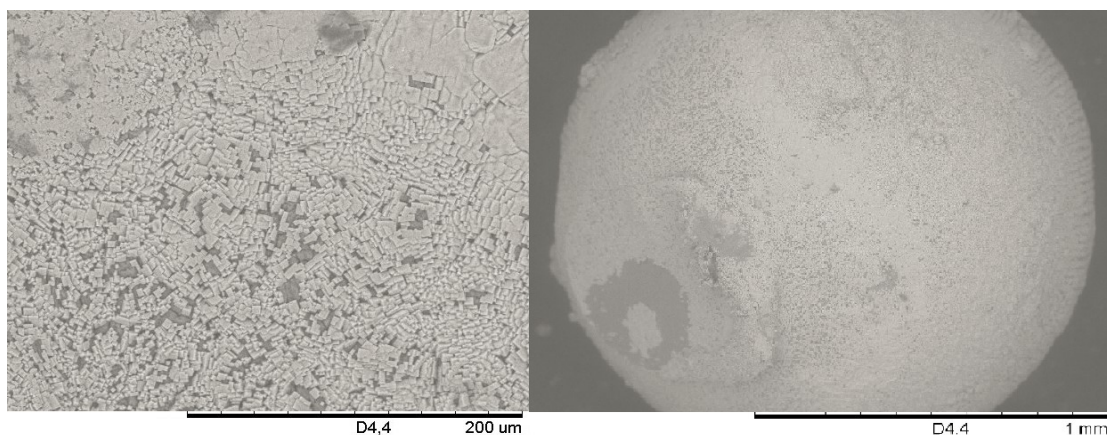
Fonte: Autoria própria.

**Figura 12.** Microscopia Ótica das esferas úmidas (A) aumento de 40 X e contraste C, (B) aumento de 100 X e contraste C



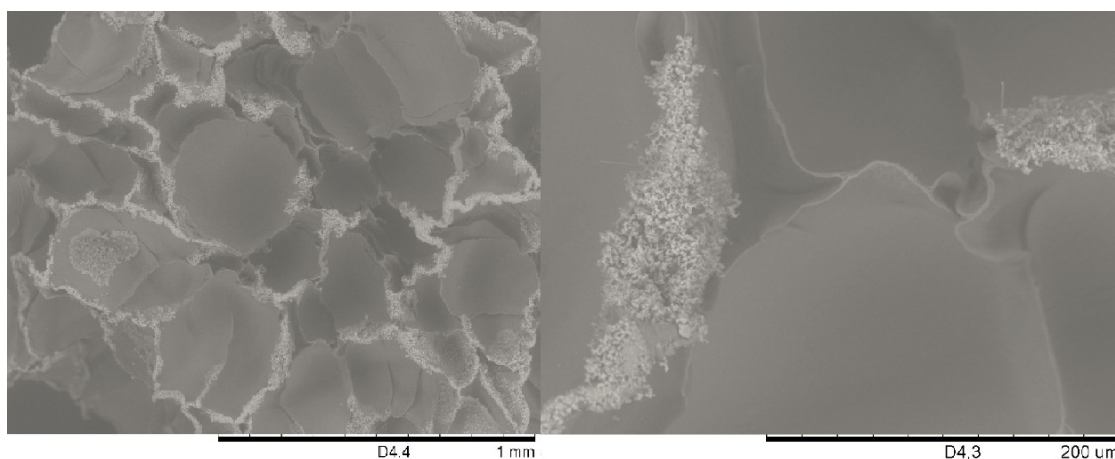
Fonte: Autoria própria.

**Figura 13.** Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da superfície externa das esferas úmidas



Fonte: Autoria própria.

**Figura 14.** Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das esferas liofilizadas



Fonte: Autoria própria.

#### **5.4 COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO DA *E. COLI* E *E. AEROGENES* APÓS O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO**

O comportamento bioquímico dos microrganismos *E. coli* e *E. aerogenes* após o processo de imobilização foi obtido pelo VITEK 2 conforme descrito no item 4.2.4 utilizando o cartão GN card (Gram-negativo).

O sistema identificou com 99% de probabilidade, indicando excelente identificação, tanto a *E. coli* (Figura 15) quanto o *E. aerogenes* (Figura 16) nas esferas analisadas após o processo de imobilização.

**Figura 15.** Resultado da identificação de *E. coli* obtido após o processo de imobilização

Microorganismo Seleccionado		99% Probabilidade <b>Escherichia coli</b>															
		Bionúmero: 0405610540566601										Confiança: Excelente identificação					
Detalhes Bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAIap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	+
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	+	64	ILATa	-			

Fonte: Carta de identificação gerada pelo Sistema computacional VITEK 2.

**Figura 16.** Resultado da identificação de *E. aerogenes* obtido após o processo de imobilização

Microorganismo Seleccionado		99% Probabilidade <b>Enterobacter aerogenes</b>															
		Bionúmero: 6625734453176010										Confiança: Excelente identificação					
Detalhes Bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	+	4	PyrA	+	5	IARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAIap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Fonte: Carta de identificação gerada pelo Sistema computacional VITEK 2.

Os resultados obtidos pelo VITEK 2 demonstram que a metodologia de imobilização em esferas de alginato de cálcio não comprometeu as características bioquímicas dos microrganismos avaliados. Assim como para Elizei (2009) que demonstrou a eficácia da imobilização de *Aspergillus niger* em alginato de sódio mantendo a viabilidade e conservando todas as características do fungo durante o período de 195 dias de avaliação. Silva (2018) também obteve bons resultados tanto

na viabilidade celular quanto na melhora da atividade enzimática com a imobilização de *Paenibacillus illinoisensis* em alginato.

O sistema VITEK 2 tem ampla utilização para identificação de microrganismos. Pinheiro et al. (2013), utilizaram para identificação de contaminantes microbianos em produtos desinfetantes de uso geral.

Higashi et al. (2015) utilizaram para identificação de leveduras, do gênero *Cândida*, em isolados clínicos.

Sony e Potty (2017) utilizaram o VITEK 2 para identificar bactérias produtoras de proteases isoladas de indústrias de processamento de alimentos.

Já Meier et al. (2016) utilizaram o sistema VITEK 2 para identificação da espécie *Cronobacter* em produtos destinados a alimentação infantil.

## **5.5 VIABILIDADE DAS ESFERAS DE *E. COLI* E *E. AEROGENES* ÚMIDAS DURANTE O PERÍODO DE ARMAZENAMENTO EM DIFERENTES TEMPERATURAS**

Para considerar um método de conservação adequado, este deve manter a viabilidade das células durante o período de armazenamento. Uma grande preocupação relacionada ao armazenamento diz respeito a estabilidade das células, visto que as bactérias apresentam um tempo de sobrevivência de acordo com as características específicas de cada espécie (PAOLI, 2005).

Nas tabelas 9 e 10 são apresentados o efeito das temperaturas de refrigeração (5 °C) e de ultracongelamento (-60 °C) e do tempo de armazenamento na viabilidade de *E. coli* e *E. aerogenes* nas esferas úmidas.

**Tabela 9** - Efeito das temperaturas de refrigeração e ultracongelamento na sobrevivência de *Enterobacter aerogenes* encapsulado conservado na forma úmida.

Microrganismos/ Tempo (dias)	<i>E.aUR</i> Log UFC g <sup>-1</sup>	<i>E.aUC</i> Log UFC g <sup>-1</sup>
0	8,85 ± 0,07 <sup>Aa</sup>	8,85 ± 0,07 <sup>Aa</sup>
30	7,64 ± 0,01 <sup>Ab</sup>	6,94 ± 0,01 <sup>Bb</sup>
60	6,93 ± 0,03 <sup>Ac</sup>	5,42 ± 0,09 <sup>Bc</sup>
90	6,47 ± 0,16 <sup>Ad</sup>	3,40 ± 0,26 <sup>Bd</sup>
120	5,78 ± 0,06 <sup>Ae</sup>	3,00 ± 0,05 <sup>Be</sup>
150	4,75 ± 0,03 <sup>Af</sup>	2,31 ± 0,08 <sup>Bf</sup>
180	3,27 ± 0,09 <sup>g</sup>	0
210	3,51 ± 0,32 <sup>g</sup>	0
240	3,48 ± 0,30 <sup>g</sup>	0

Fonte: Dados da pesquisa.

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem estatisticamente na linha (Tukey p<0,05)

Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente na coluna (Tukey p<0,05)

**Tabela 10** - Efeito das temperaturas de refrigeração e ultracongelamento na sobrevivência de *Escherichia coli* encapsulado conservado na forma úmida.

Microrganismos/ Tempo (dias)	<i>E.cUR</i> Log <sub>10</sub> UFC g <sup>-1</sup>	<i>E.cUC</i> Log <sub>10</sub> UFC g <sup>-1</sup>
0	8,35 ± 0,16 <sup>Aa</sup>	8,35 ± 0,16 <sup>Aa</sup>
30	7,20 ± 0,08 <sup>Ab</sup>	6,82 ± 0,01 <sup>Bb</sup>
60	6,70 ± 0,02 <sup>Ac</sup>	6,76 ± 0,02 <sup>Ab</sup>
90	6,33 ± 0,06 <sup>Ad</sup>	5,85 ± 0,13 <sup>Bc</sup>
120	5,69 ± 0,01 <sup>Ae</sup>	4,88 ± 0,03 <sup>Bd</sup>
150	5,62 ± 0,02 <sup>Aef</sup>	4,73 ± 0,12 <sup>Bde</sup>
180	5,44 ± 0,12 <sup>Af</sup>	4,36 ± 0,26 <sup>Bef</sup>
210	4,65 ± 0,04 <sup>Ag</sup>	4,05 ± 0,13 <sup>Bf</sup>
240	4,44 ± 0,06 <sup>Ag</sup>	3,50 ± 0,30 <sup>Bg</sup>

Fonte: Dados da pesquisa.

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem estatisticamente na linha (Tukey p<0,05)

Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente na coluna (Tukey p<0,05)

A conservação sob refrigeração ao longo dos 240 dias de armazenamento das esferas de *E. aerogenes* apresentou os melhores resultados de sobrevivência com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparada com o armazenamento sob ultracongelamento (Tabela 9).

Os encapsulados de *E. aerogenes* armazenados sob ultracongelamento tiveram uma queda em seu desenvolvimento de 74% no período de 150 dias, apresentando a perda total da viabilidade a partir de 180 dias após a imobilização, quando a bactéria não foi mais capaz de crescer. Esses resultados demonstraram que a temperatura de armazenamento é um fator significativo para manter a viabilidade do imobilizado de *Enterobacter aerogenes*, visto que a diferença para as



esferas armazenadas sob refrigeração neste mesmo período era de mais de 2 log UFC g<sup>-1</sup>.

Para as esferas conservadas sob refrigeração a redução na contagem de células passou de 10<sup>8</sup> UFC g<sup>-1</sup> (dia 0) para 10<sup>3</sup> UFC g<sup>-1</sup> (dia 240). A redução na contagem de células apresentou diferença significativa até 150 dias de conservação, sendo que a partir desse período até os 240 dias avaliados não houve diferenças significativas nas contagens ( $p > 0,05$ ).

Para *E. coli* o armazenamento sob o ultracongelamento proporcionou uma redução na contagem de células de 10<sup>8</sup> UFC g<sup>-1</sup> (dia 0) para 10<sup>3</sup> UFC g<sup>-1</sup> (dia 240), representando 58%. Já a condição de refrigeração apresentou uma redução gradativa no número de células viáveis chegando ao final dos 240 dias com 4,44 log UFC g<sup>-1</sup>, o que representa uma perda de viabilidade de 47%.

Os resultados observados na presente pesquisa para conservação das esferas úmidas sob refrigeração e sob ultracongelamento se assemelham aos obtidos por Etchepare (2014), que avaliou a viabilidade de *Lactobacillus aciophilus* La-14 imobilizado em alginato e conservado sob temperatura de refrigeração por um período de 135 dias.

Em comparação aos resultados obtidos por Nualkaekul et al. (2012), que estudaram a viabilidade de *Lactobacillus plantarum* imobilizado em alginato e quitosana durante a estocagem a 4 °C por 42 dias e verificaram viabilidade superior a 5,5 log UFC mL<sup>-1</sup>.

Os resultados da presente pesquisa mostram uma viabilidade superior (6,0 log UFC g<sup>-1</sup>) para o mesmo período de armazenamento.

Os resultados obtidos nas condições de armazenamento em baixas temperaturas para as esferas úmidas devem-se ao fato de que, o armazenamento sob essas condições, por longos períodos de tempo, pode acarretar danos à parede celular pela formação de cristais de gelo que crescem e rompem a estrutura celular e molecular dos microrganismos o que acarreta em danos irreversíveis a estrutura da membrana, incluindo rupturas, podendo ocasionar a morte celular (HUBÁLEK, 2003; PAOLI 2005 e TORTORA et al., 2012; XU et al., 2016).

Os danos ocasionados pelo ultracongelamento poderiam ser amenizados pelo uso crioprotetores, que tem como principal objetivo reduzir as injúrias nas células, como foi constatado nos trabalhos de Halim et al. (2017), Lu et al. (2017) e Shu et al.

(2018). Dentre os crioprotetores utilizados, pode-se citar o leite desnatado, polissacarídeos, dimetil sulfóxido (DMSO) ou glicerol (SAEKI et al., 2015).

Bernucci et al (2017) obtiveram resultados satisfatórios para *Bifidobacterium longum* 5<sup>1A</sup> encapsulado em alginato, utilizando polissacarídeo como crioprotetor, durante o armazenamento por 90 dias sob congelamento. Cruz et al. (2015) também mantiveram a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* previamente ativado em leite desnatado para posterior imobilização em alginato, por 90 dias sob congelamento. Já Homayouni et al. (2008) produziram cápsulas de alginato com glicerol e alcançou 180 dias de viabilidade para *Lactobacillus casei* (Lc-01) e *Bifidobacterium lactis* armazenados sob congelamento.

Os resultados obtidos pelos pesquisadores citados demonstram a necessidade da utilização de crioprotetores associados ao processo de imobilização para garantir a eficiência da proteção às células durante a estocagem sob temperaturas de congelamento.

Elizei (2009) avaliou a sobrevivência e a viabilidade de três espécies de fungos (*Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium solitum*) encapsulados em alginato e armazenados em três temperaturas (ambiente, geladeira e freezer) e concluiu que a temperatura mais adequada para preservação foi a de geladeira que permitiu a viabilidade das três espécies de fungos avaliados por um período mais longo que foi em torno de 210 dias.

Os resultados desta pesquisa também demonstram que a conservação sob temperatura de refrigeração das esferas úmidas garante os melhores resultados de sobrevivência, sendo observado contagens de 3,48 Log UFC g<sup>-1</sup> para *E. aerogenes* e 4,44 Log UFC g<sup>-1</sup> para *E. coli* no final dos 240 dias avaliados.

A conservação sob refrigeração ao longo dos 240 dias de armazenamento das esferas de *E. aerogenes* apresentou os melhores resultados de sobrevivência com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparada com o armazenamento sob ultracongelamento (Tabela 9).

A redução do tamanho das esferas armazenadas úmidas ultracongeladas e refrigeradas para os dois microrganismos estudados pode ter sido responsável pelos resultados da viabilidade das células imobilizadas durante o período de armazenamento já que o tamanho da camada protetora está relacionado com o número de células aprisionadas (LOTFIPOUR et al., 2012).

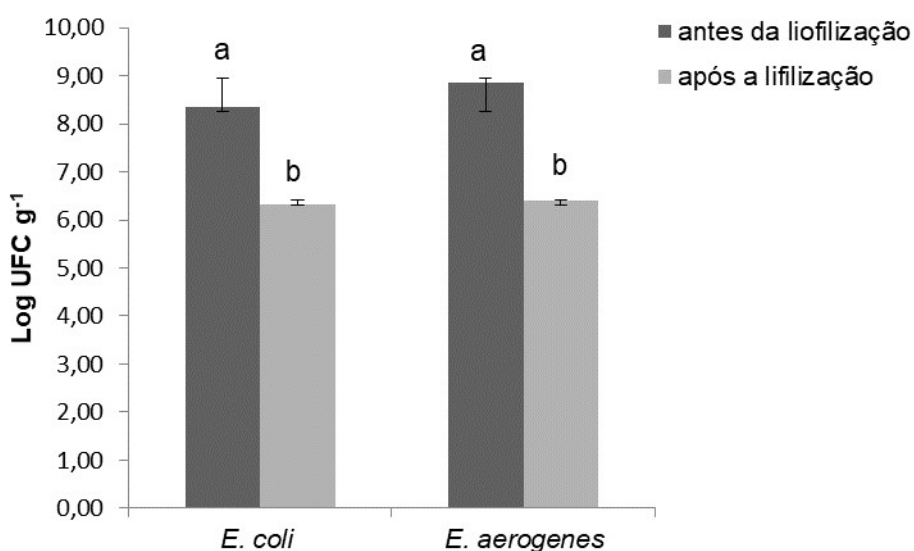


A diminuição da camada protetora proveniente da redução da quantidade de água é uma característica que pode reduzir o metabolismo das células quando armazenadas. A redução da quantidade de água associada a temperaturas baixas torna o metabolismo ainda mais lento, possibilitando a viabilidade das células microbianas por longos períodos (GIROTTTO et al., 2008). Mas estes fatores também podem ser responsáveis por produzir danos mecânicos, bioquímicos e osmóticos, incluído a letalidade da célula (CARVALHO, 2007).

## 5.6 VIABILIDADE DAS ESFERAS DE *E. COLI* E *E. AEROGENES* LIOFILIZADAS DURANTE O PERÍODO DE ARMAZENAMENTO SOB CONGELAMENTO

Antes do processo de liofilização, as esferas úmidas para *E. coli* e *E. aerogenes* obtiveram contagens de 8,35 log UFC g<sup>-1</sup> e 8,85 log UFC g<sup>-1</sup>, respectivamente. Após a liofilização houve uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na contagem de *E. coli* para 6,33 log UFC g<sup>-1</sup> e 6,40 log UFC g<sup>-1</sup> para *E. aerogenes* (Figura 17).

**Figura 17.** Viabilidade dos microrganismos antes e após o processo de secagem por liofilização



Médias seguidas de letras minúsculas para os dois microrganismos diferem estatisticamente (Tukey  $p < 0,05$ ).

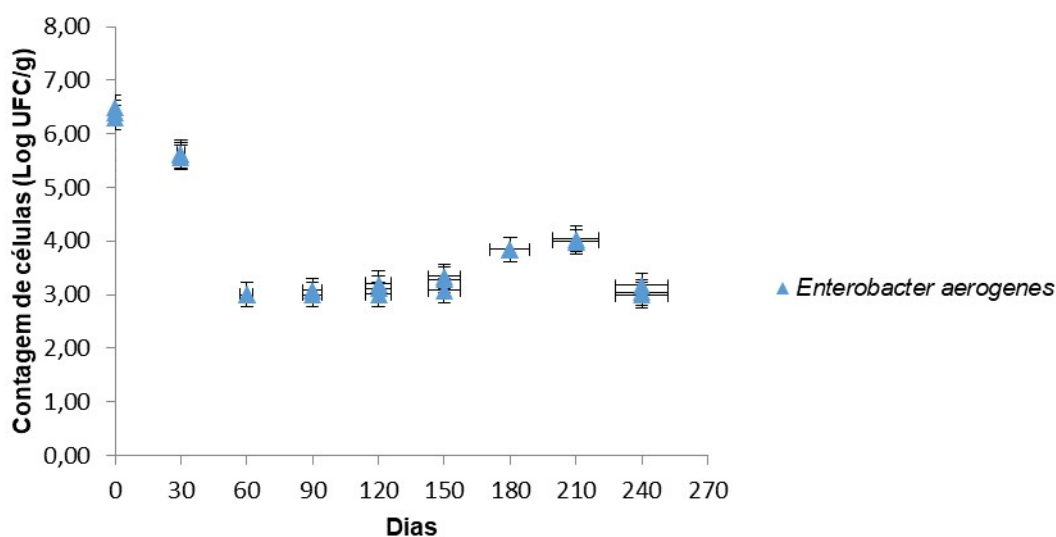
Fonte: Autoria própria.

Já é esperada uma perda de células viáveis após a liofilização, pois durante esse processo as células são submetidas a condições ambientais extremas como a temperatura e atividade de água o que podem induzir a danos estruturais e fisiológicos em muitas espécies (CARVALHO et al., 2004 e BERNUCCI, 2017). A viabilidade celular após o processo de liofilização varia em função da estirpe do microrganismo e do uso e eficácia de agentes protetores (BERNUCCI, 2017).

Martin-Dejardin et al. (2013) avaliaram a viabilidade de *B. bifidum*, encapsulada em alginato, antes e após a liofilização. Os autores observaram perda significativa na viabilidade das células após a liofilização, com aumento de células injuriadas e redução de células vivas e concluíram que a adição de crioprotetores nas esferas melhorou a viabilidade de *B. bifidum* aprisionado.

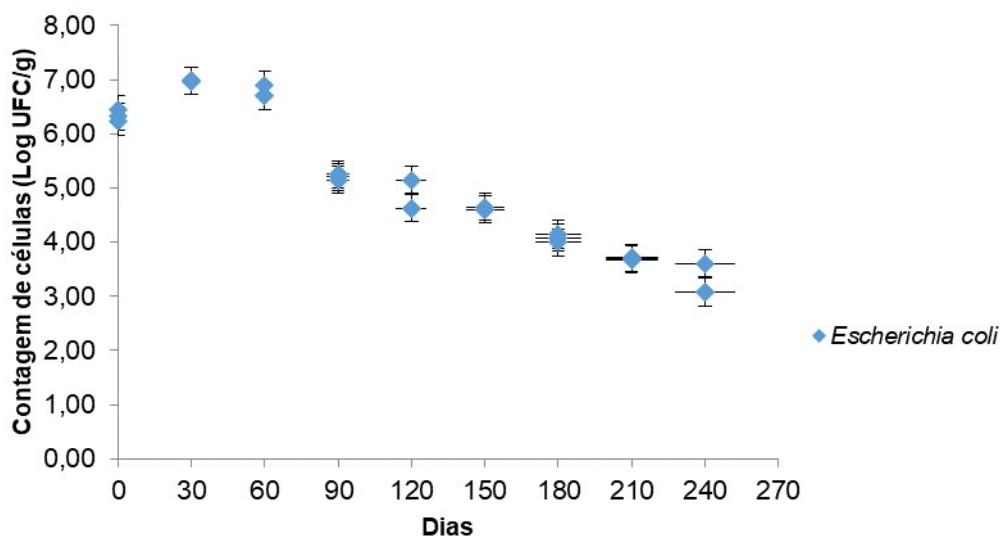
Nas Figuras 18 e 19 são apresentadas a contagem de células ao longo dos 240 dias de armazenamento das esferas liofilizadas mantidas sob congelamento para *E. aerogenes* e *E.coli*, respectivamente.

**Figura 18.** Viabilidade do *Enterobacter aerogenes* liofilizado armazenado sob congelamento



Fonte: Autoria própria.

**Figura 19.** Viabilidade da *Escherichia coli* liofilizada armazenada sob congelamento



Fonte: A autora

De modo geral os resultados indicam que a *E. coli* teve maior resistência ao congelamento que a *E. aerogenes*. E mesmo com uma redução na contagem de 52% para *E. coli* e 49% para *E. aerogenes*, ainda pode ser considerado que a temperatura de congelamento das esferas liofilizadas manteve a viabilidade dos dois microrganismos estudados durante o período de 240 dias de monitoramento.

Bruno e Shah (2003) evidenciaram que o armazenamento sob temperatura de congelamento (-18 °C) garantiu maior viabilidade da bifidobactéria liofilizada quando comparada com a temperatura de armazenamento de 20 °C.

Para *E. aerogenes* por meio da Figura 18 é percebido uma redução acentuada na contagem de células viáveis nos primeiros 60 dias de armazenamento, com um decréscimo na contagem total de células de aproximadamente 3 log. E após este período até 240 dias de armazenamento é percebido que os resultados se mantiveram constantes com contagens em torno de 3 log UFC g<sup>-1</sup>.

Para *E. coli* (Figura 19), a contagem de células sofre reduções gradativas ao longo do período de armazenamento avaliado de 240 dias.

Os resultados obtidos nessa pesquisa foram inferiores ao obtido por Bernucci (2017) que manteve a viabilidade celular sem diferença estatística na porcentagem de sobrevivência *B. longum* 5<sup>1A</sup> imobilizados em alginato com quitosana e glicose

10%, liofilizados e armazenados a -20 °C ao longo de 90 dias. O que reforça a importância do uso de crioprotetores para preservação das células.

Brachkova et al. (2010) relataram ser possível a imobilização de diferentes cepas de *Lactobacillus* em alginato de cálcio, sendo que mesmo com uma diminuição na concentração celular após o processo de imobilização e posterior liofilização, ainda manteve uma contagem viável num período de 6 meses de armazenamento sob refrigeração.

## **5.7 COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO DAS ESFERAS DE *E. COLI* E *E. AEROGENES* ÚMIDAS E LIOFILIZADAS DURANTE O PERÍODO DE ARMAZENAMENTO EM DIFERENTES TEMPERATURAS**

Os resultados obtidos por meio da avaliação do crescimento da *Escherichia coli* nos Petrifilms permitiram observar que para as esferas úmidas refrigeradas (*E.cUR*) houve o crescimento de colônias típicas de *E. coli* (colônias azuis com produção de gás) até os 120 dias de armazenamento. Com 150 dias de armazenamento o microrganismo perdeu a capacidade de produzir a enzima Beta glucorosidase, apresentando crescimento nas placas de Petrifilm de colônias vermelhas com produção de gás, característico de coliformes totais sem a confirmação de *E. coli*. A partir da avaliação de 180 dias de armazenamento, o crescimento nas placas de Petrifilm foi de pequenas colônias vermelhas sem produção de gás até o período avaliado de 240 dias.

Enquanto que para as esferas úmidas ultracongeladas (*E.cUC*) houve o crescimento de colônias típicas de *E. coli* nos Petrifilms (colônias azuis com produção de gás) até 60 dias de armazenamento. Após este período houve crescimento de colônias vermelhas sem produção de gás até o período avaliado de 240 dias.

Já para as esferas liofilizadas congeladas (*E.cLC*) houve o crescimento de colônias típicas de *E. coli* nos Petrifilms (colônias azuis com produção de gás) até os 150 dias de armazenamento. Após este período houve crescimento de colônias vermelhas sem produção de gás até o período avaliado de 240 dias.

Nota-se que mesmo após perder a capacidade de produção da enzima beta glucuronidase e capacidade de produção de gás (Figura 20) a *E. coli* manteve crescimento nas placas de Petrifilm, até o final do período avaliado de 240 dias de armazenamento, de 3,25, 4,44 e 3,50 log UFC g<sup>-1</sup> para as esferas liofilizadas congeladas, úmidas refrigeradas e úmidas ultracongeladas, respectivamente.

**Figura 20** Crescimento atípico de *E. coli* em placa de petri. Colônias vermelhas sem produção da enzima beta glucuronidase e sem produção de gás



Fonte: Autoria própria.

Além do crescimento de colonias atípicas nas placas de petri, os resultados obtidos pelo VITEK 2 identificaram os microrganismos das esferas de *E.cUR*, *E.cUC* e *E.cLC* ao final dos 240 dias de armazenamento como sendo *Salmonella* enterica (Figura 21), fato explicado pela diferença nos resultados obtidos para os teste de: BETA-GALACTOSIDASE (BGAL) poço 9, PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub>S (H<sub>2</sub>S) poço 10, GAMA-GLUTAMIL-TRANSFERASE (GGT) poço 14, CITRATO (SÓDIO) (CIT) poço 36, BETA-GLUCURONIDASE (BGUR) poço 57, RESISTÊNCIA O/129 (comp.vibrio.) (O129R) poço 58 e ELLMAN (ELLM) poço 62.

**Figura 21** Resultado da identificação de *E. coli* após o período de 240 dias de armazenamento para as eferas E.cUR, E.cUC e E.cLC

Microrganismo Seleccionado		99% Probabilidade		Salmonella enterica ssp enterica		Bionúmero: 0017610441566210		Confiança: Excelente identificação									
Detalhes Bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	+	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHiSa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Fonte: Carta de identificação gerada pelo Sistema computacional VITEK® 2

Os resultados chamam atenção para as enzimas Beta-glucuronidase (BGUR) e Beta-galactosidase (BGAL) que são positivas para *E.coli* e negativas para *Salmonella*.

As glicosil-hidrolases são um grupo de enzimas que hidrolisam a ligação glicosídica em carboidratos ou seus derivados. A Beta-glucuronidase é uma glicosil hidrolase que hidrolisa os resíduos do ácido Beta-glucurônico a partir dos terminais não redutores de glicosaminoglicanos. A Beta-glucuronidase da *Escherichia coli* é uma enzima bastante investigada (ARUL et al., 2008).

Kilian e Bulow (1976) descreveram pela primeira vez a associação da enzima Beta-glucuronidase com as espécies *Escherichia coli* e *Shigella* dentro da família das Enterobactérias. A partir disso, os substratos da Beta-glucuronidase começaram a ser incorporados em diversos meios com o objetivo de detectar *E. coli* em amostras de várias fontes, como ambiental, alimentar e clínica (RICE et al., 1990). A maioria das cepas de *E. coli* (90 a 95%) possuem o gene para beta-glucuronidase, portanto essa atividade enzimática pode ser considerada como marcador seletivo para detecção desse microrganismo (CARUSO et al., 2017). Além disso, a produção de gás, devido a fermentação de açúcares, também é uma característica desse microrganismo (KONEMAN et al., 2001).

A Beta-galactosidase é uma enzima indutível, ou seja, sua expressão varia conforme as necessidades celulares, existente nos microrganismos fermentadores de lactose, que hidrolisa a lactose para formar galactose e glicose. Todas as estirpes de *E. coli* possuem a enzima Beta-galactosidase (JUERS et al., 2012).

A atividade da Beta-glucuronidase e da Beta-galactosidase podem ser detectadas usando diferentes substratos cromogênicos e fluorogênicos através de métodos espectrofotométricos e fluorométricos. Substratos ácidos também estão disponíveis para detecção de Beta-glucuronidase (TAGI, 2001). Porém Schets et al. (2001), relataram que os métodos que determinam *E. coli* somente por meio da detecção da Beta-glucuronidase ou pela observação da produção de gás não são eficazes, devido a alta incidência de falsos negativos que esses métodos podem apresentar.

A inibição enzimática da Beta-glucuronidase e da Beta-galactosidase, comprovada no Petrifilm e no VITEK 2, pode estar associada às injúrias, por choque térmico, sofridas pela célula durante o processo de secagem por liofilização e nas condições de temperatura de armazenamento. Este fato poderia ter sido minimizado pelo uso de crioprotetores. Além disso, as células não foram recuperadas em meio de enriquecimento antes do plaqueamento nas placas de petri, podendo essa ser a explicação do crescimento de colônias atípicas, visto que o método empregado para liberação das células das esferas não tinha capacidade de recuperação celular.

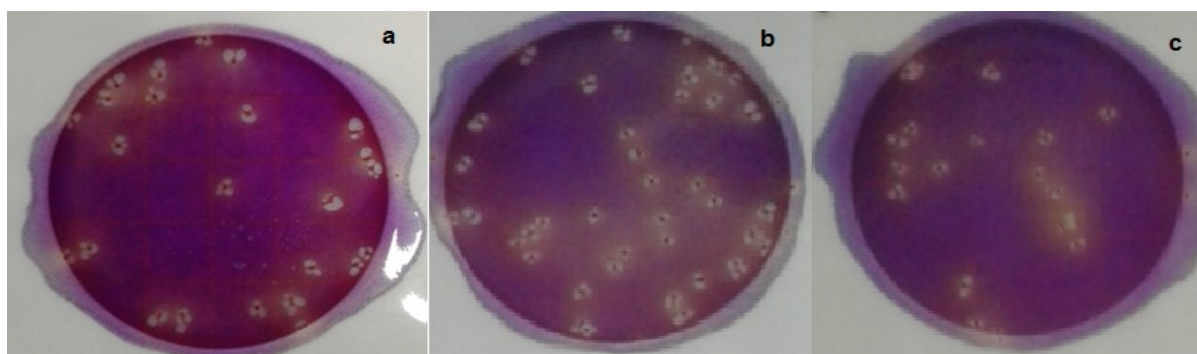
Ainda, poderia ser considerado que a não produção da enzima Beta-galactosidase, responsável pela fermentação da lactose e produção de gás, seja devido ao fato de que células injuriadas podem não produzir a enzima no tempo de incubação recomendado pela metodologia, podendo gerar resultados falso-negativos (MARQUEZI et al., 2010)

Para a *E. aerogenes*, a avaliação dos resultados obtidos nos Petrifilms permitiram observar que para as esferas úmidas refrigeradas (*E.aUR*) e para as esferas liofilizadas congeladas (*E.aLC*) houve o crescimento de colônias típicas de *E. aerogenes* (como colônias vermelhas circundadas por zonas amarelas com produção de gás) em todas as avaliações realizadas ao longo dos 240 dias de armazenamento.

Já para as esferas úmidas ultracongeladas (*E.aUC*) houve o crescimento de colônias típicas de *E. aerogenes* (como colônias vermelhas circundadas por zonas amarelas com produção de gás) nos Petrifilms até 150 dias de armazenamento. Após este período, até os 240 dias de armazenamento, não houve crescimento de colônias nos Petrifilms.

Por meio da Figura 22 pode-se confirmar o crescimento característico de *E. aerogenes* imobilizado nas esferas *E.aUR*, *E.aUC* e *E.aLC*.

**Figura 22** Crescimento de colônias típicas de *E. aerogenes*: a-*E.aUC* em 150 dias, b- *E.aUR* em 240 dias e c-*E.aLC* em 240 dias



Fonte: Autoria própria.

O crescimento de colônias típicas de *E. aerogenes* apresentados no Petrifilm corroboram com os resultados do comportamento bioquímico obtido através do equipamento VITEK 2 que identificaram as colônias de *E.aUR* e *E.aLC* com 99% de probabilidade classificando a identificação como excelente (Figura 23).

**Figura 23** Resultado da identificação de *E.aerogenes* após o período de 240 dias de armazenamento para as esferas *E.aUR* e *E.aLC*

Microrganismo Selecionado		99% Probabilidade <i>Enterobacter aerogenes</i>															
		Bionúmero: 6625734453176010										Confiança: Excelente identificação					
Detalhes Bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	+	4	PyrA	+	5	IARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAIap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Fonte: Carta de identificação gerada pelo Sistema computacional VITEK<sup>®</sup> 2

Os resultados obtidos sugerem que, para o *Enterobacter aerogenes*, a condição de temperatura de armazenamento das esferas de alginato, não teve interferência no perfil bioquímico deste microrganismo, preservando suas características durante o período de armazenamento.

Saeki et al. (2015) mantiveram a viabilidade das cepas de *E. coli* ATCC 25922 e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 preservadas sob congelamento comum



entre -10 a -20°C com os crioprotetores glicerol a 20% e leite desnatado a 15%, após a refrigeração por 5 dias, por um período de um ano e três meses. Porém, nesse estudo, foi avaliado unicamente o crescimento, não foram realizados testes bioquímicos para confirmação dos microrganismos.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método desenvolvido neste estudo utilizando alginato de sódio 2% como material encapsulante mostrou ser adequado para imobilização dos microrganismos *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, permitindo a formação de esferas de diâmetro uniforme (diâmetro médio de 3,52 mm) e eficiência de imobilização superior a 99%.

A utilização das técnicas de microscopia eletrônica e microscopia eletrônica de varredura para caracterização morfológica revelaram para as esferas úmidas o formato esférico com característica espessa e pequenas irregularidades na superfície e para as esferas liofilizadas revelaram a característica esférica com superfície enrugada e sulcos bem definidos, e possibilitou a visualização das células aglomeradas entre os poros.

O armazenamento das esferas úmidas sob refrigeração (*E.cUR* e *E.aUR*) e ultracongelamento (*E.cUC* e *E.aUC*) garantiram a viabilidade dos microrganismos imobilizados. No entanto, os resultados obtidos sugerem que o armazenamento sob ultracongelamento teve uma influência maior na redução da viabilidade dos microrganismos, quando comparado ao armazenamento sob refrigeração.

A temperatura de refrigeração (5 °C) manteve a viabilidade das esferas úmidas acima de 3 Log UFC g<sup>-1</sup> para *E. aerogenes* e acima de 4 Log UFC g<sup>-1</sup> para *E. coli* ao final do período de 240 dias avaliados. Na temperatura de ultracongelamento (-60 °C) houve uma redução da viabilidade de *E. aerogenes* em 74% no período de 150 dias e após esse período não houve crescimento nas placas de Petrifilm. Para *E. coli* na temperatura de ultracongelamento houve uma redução da viabilidade de 58% ao final dos 240 dias de armazenamento.

A secagem das esferas através do processo de liofilização é adequado para manutenção das células após a imobilização. As esferas conservadas liofilizadas congeladas (-18 °C) apresentaram uma redução menor da viabilidade quando comparadas com as esferas úmidas, sendo de 49 e 52% para *E.cLC* e *E.aLC* respectivamente, visto que esses resultados podem ser melhorados com a utilização agentes que auxiliem na proteção das células durante o processo de liofilização.

Quanto ao comportamento bioquímico dos microrganismos nenhuma das condições de armazenamento promoveu alterações nas características do *E. aerogenes*. Já para *E. coli*, alterações bioquímicas foram percebidas ao longo dos 240 dias de armazenamento. O armazenamento das esferas úmidas ultracongeladas foi o que afetou as células de *E. coli* no menor tempo de armazenamento, onde o crescimento de células típicas foi verificado somente até 60 dias. O armazenamento das esferas liofilizadas congeladas foi o que preservou as características das células de *E. coli* por um período de tempo maior (150 dias).

Com estes resultados, acredita-se que o método de imobilização celular em esferas de alginato de cálcio é uma técnica promissora para a manutenção das culturas de *E. coli* e *E. aerogenes*.

A metodologia de imobilização de células microbianas em esferas de alginato de cálcio desenvolvida nesta pesquisa é promissora para ser utilizada pelo Provedor de Ensaio Proficiência do SENAI Chapecó como técnica de manutenção celular.

## **7 CONSIDERAÇÕES PARA FUTUROS ESTUDOS**

Para trabalhos futuros sugere-se a utilização de crioprotetores para auxiliar na proteção das células imobilizadas armazenadas na forma úmida ultracongelada e na forma liofilizada. Sugere-se ainda o estudo da imobilização para outros microrganismos incluindo bactérias gram positivas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA) Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington, 676p. 2001.

ANDRADE, Claudia. L. **Histopatologia e identificação da *Escherichia coli* como agente causal da celulite aviária em frangos de corte**. 2005. 62 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2005.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **International Official Method of Analysis**, 19<sup>th</sup> ed. AOAC International. Arlington. VA. Method 2003.01, 2012.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **International Official Method of Analysis**, 19<sup>th</sup> ed. AOAC International. Arlington. VA. Method 998.08, 2012.

ARUL, Loganathan; BENITA, George; BALASUBRAMANIAN Ponnusamy. Functional insight for  $\beta$ -glucuronidase in *Escherichia coli* and *Staphylococcus sp.* *RLH1. Bioinformation*, v.2, n.8, p.339-343, 2008.

BATISTA, Marcio de A. **Estudo da Imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em gel de alginato de cálcio no processo de fermentação alcoólica**. 2005. 114 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlandia, 2005.

BAYLIS, Chris; UYTENDAELE, Mieke; JOOSTEN, Han; DAVIES, Andy. The Enterobacteriaceae and their Significance to the Food Industry. **ILSI Europe Report Series**, 2011.

BERNUCCI, Beatriz S. P. et al. Effect of microencapsulation conditions on the viability and functionality of *Bifidobacterium longum* 5<sup>1A</sup>. **LWT - Food Science and Technology**. v. 80, p. 341-347, 2017.

BERNUCCI, Beatriz Silva Pereira. **Microencapsulação de *Bifidobacterium longum* 5<sup>1A</sup> incorporada em farinha de aveia**. 2017. 137 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Belo Horizonte, 2017.

BRACHKOVA, Mariya I.; DUARTE, Maria A.; PINTO, João F. Preservation of viability and antibacterial activity of *Lactobacillus* spp. in calcium alginate beads. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 41, p. 589–596, 2010.

BRETÓN, N. A. G. E MUNGUÍA, T. J. Encapsulación: técnicas y aplicaciones en la industria alimentaria. **Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos**, San Andrés Cholula, v. 2, p. 36-49, 2008.

BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA** – uma introdução. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

BRUNO, F. A. & SHAH, N. P. Viability of two freeze-dried strains of *Bifidobacterium* and commercial preparations at various temperatures during prolonged storage. **Food Microbiology and Safety**, n. 68, p. 2336–2339, 2003.

CAMPOS, Leila C.; TRABULSI, Luiz R. **Escherichia**. In.: TRABULSI, L.R. et al. Microbiologia. 3 ed., p.215-228, São Paulo: Atheneu, 2002.

CANILHA, Larissa; CARVALHO, Walter de; SILVA, ALMEIDA, João B. Biocatalizadores imobilizados: uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.36, n.6, p.48-57. 2006.

CAVALHEIRO, Carlos P. et al. Encapsulação: alternativa para a aplicação de microrganismos probióticos em alimentos termicamente processados. **Ciência e Natura**. v. 37, p. 65-74, 2015.

CARUSO, G. et al.  $\beta$ -glucuronidase activity determination as an indirect estimate of *Escherichia coli*: development of a miniaturized assay and its application to seawater samples. **Journal of Clinical Microbiology and Biochemical Technology**, v. 3, p. 046-050, 2017.

CARVALHO, Ana S.; SILVA, Joana; HO, Peter; TEIXEIRA, Paula.; MALCATA, F.Xavier; GIBBS, Paul Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, n.4, p.835–47, 2004.

CARVALHO, Fabiano de. Indução de estruturas esféricas ou similares a cristalização da água por processos físicos ou químicos. **Ciência Agrotécnica**, v. 31, n. 3, p. 814-820, 2007.

CHANDRAMOULI, V.; KAILASAPATHY, K.; PEIRIS, P.; JONES, M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. In simulates gastric conditions. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 27-35, Jan. 2004.

CHEN, Jiambo; XU, Yi; XIN, Jiaying; LI, Shuben; XIA, Chungu; CUI, Junru. Efficient immobilization of whole cells of *Methylobacterium* sp. strain GYJ3 by sol-gel entrapment. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 30, n. 3-4, p. 167-172, 2004.

COVIZZI, Luiz G.; GIESE, Ellen C.; GOMES, Eleni; DEKKER, Robert F. H.; SILVA, Roberto da. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v.28. p. 143-160, 2007.

CORCORAN, E. The production and use of immobilized living microbial cells. In: WISEMAN, A. **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology**, v. 10, p. 12-50, 1985.

CORRÊA, F. A. F. **Características dos patótipos de *E. coli* e implicações de *E. coli* patogênica para aves em achados de abatedouros frigoríficos.** 2012. 37 f. Universidade Federal de Goiás. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Goiânia, 2012.

CORTEZ, Daniela V.; CASTRO Heizir F. de; ANDRADE, Grazielle S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, v. 40, N. 1, p. 85-96, 2017.

CRUZ, Richtier G.; PEREIRA, Samarina G. F.; ARAÚJO, Emiliane A.; DORES, Milene T. Viability of *Lactobacillus acidophilus* Immobilized in Calcium Alginate Spheres and Submitted to Different Conditions of Stress. **Nutrition and Food Technology: Open Access**, v. 1, n. 1, 2015.

DOLLY, P.; ANISHAPARVIN, A.; JOSEPH, G. S.; ANANDHARAMKRISHNAN, C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) by spray-freezedrying method and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Microencapsultaion**, v. 28. n. 6, p.568-574, 2011.

ELIZEI, Virginia G. **Avaliação da Viabilidade de Fungos encapsulados e armazenados em diferentes temperaturas.** 2009. 50 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

ELIZEI, Virgínia Guerra et al. Imobilização de fungos filamentosos com potencial para uso agroindustrial. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 2, p. 165-172, 2014.

ETCHEPARE, Mariana de Araújo. **Produção, caracterização e viabilidade de micropartículas com *Lactobacillus acidophilus* obtidas por geleificação iônica.** 2014. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

FARBO , Maria G.; URGEGHE, Pietro P.; FIORI, Stefano; MARCEDDU, Salvatore; JAOUA, Samir; MIGHELI, Quirico. Adsorption of ochratoxin A from grape juice by yeast cells immobilised in calcium alginate beads. **International Journal of Food Microbiology**, v. 217, p. 29–34, 2016.

FERREIRA, A. J. P.; KNOBL, T. Colibacilose. IN: JUNIOR, A. B.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. D.; SESTI, L. ZUANAZE, M. A. **Doença das aves.** 2 ed. Campinas: Fundação APINCO. p. 457-471, 2009.

FRANCO, Robson M. *Escherichia coli*: Ocorrência em suínos abatidos na Grande Rio e sua viabilidade experimental em linguíça frescal tipo toscana. 2002. 144 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2002.

FRAZÃO, Luciana A. **Estudo comparativo de métodos bioquímicos, perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e método molecular para a caracterização fenotípica e genotípica de bactérias ácido-láticas isoladas da microbiota fecal de Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) no Brasil**. 2014. 103 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2014

FUNKE, G. et al. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of medically relevant gram-negative rods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1948–1952, 1998.

GIRÃO, Marília Dutra et al. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37, n.3, p.229-233, 2004.

GIROTTI, Marcos J.; et al. Uso de fungos nematófagos no controle biológico de nematoides parasitas: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.10, n.6, p.1-7, 2008.

GÓRAK, Monika e ŻYMAŃCZYK, Ewa Duda. Reductive Activity of Free and Immobilized Cells of Cyanobacteria toward Oxophosphonates—comparative Study. **Journal of Applied Phycology**, v.29, n.1, p. 245–253, 2017.

GUEDES, A.C.; GOEDERT, C.O.; BUSTAMANTE, P.G. **Estratégia Nacional de Diversidade Biológica** – CDB, artigo 9, conservação *ex situ*. Grupo de trabalho temático 3 – GTT3. Brasília, 1998.

GUL, Osman; DERVISOGLU, Muhammet. Dervisoglu Application of multicriteria decision technique to determine optimum sodium alginate concentration for microencapsulation of *Lactobacillus casei* Shirota by extrusion and emulsification. **Journal of Food Process Engineering**, v. 40, p. 1-10, 2016.

GUO, Lin X.; DENG, Gang; XU, Jian; WANG, Mei X. Immobilization of *Rhodococcus* sp. AJ270 in alginate capsules and its application in enantioselective biotransformation of trans-2-methyl-3-phenyl-oxiranecarbonitrile and amide. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, n.1, p.1-5, 2006.

HAGHSHENAS, B. et al. Microencapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* 15HN using alginate-psyllium-fenugreek polymeric blends. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 1048-1057, 2015.

HALIM, Murni; et al. Effect of encapsulant and cryoprotectant on the viability of probiotic *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 during freeze-drying and exposure to high acidity, bile salts and heat. **LWT-Food Science and Technology**, v. 81, p. 210-216, August, 2017.

HELGERUD, T. et al. Alginates, in Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents, FMC BioPolymer, p. 50-72, 2010.

HIGASHI Carolina M. et al. Comparação do sistema de identificação automatizado Vitek 2 e PCR-ITS para caracterização das espécies dos isolados clínicos de *Candida* spp. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 36, n. 1, p. 233-242, 2015.

HOMAYOUNI, A. et al. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of symbiotic ice-cream. **Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 50-55, 2008.

HUBÁLEK, Zdene. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v. 46, p. 205-229, 2003.

ISLAM, Shahidul Md.; KARIM, Mohammad R. Fabrication and characterization of poly(vinyl alcohol)/alginate blend nanofibers by electrospinning method. **Colloids and Surfaces A: Physicochem Engineering Aspects**, v. 366, p. 135–140, 2010.

JASSON, V. et al. Alternative microbial methods: an overview and selection criteria. **Food Microbiology**, v.27, p.710-730, 2010.

JEGANNATHAN, Kenthorai R.; ABANG, Sariah.; PONCELET, Denis.; CHAN, Eng S.; RAVINDRA, Pogaku. Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase—A Critical Review. **Biotechnology**. v. 28, p. 253-264, 2008.

JIN, Y. et al. The whole-cell immobilization of D-hydantoinase-engineered *Escherichia coli* for D-CpHPG biosynthesis. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 21, p. 43-48, 2016.

JUERS, Douglas H.; MATTHEWS, Brian W.; HUBER, Reuben E. *LacZ* B-Galactosidase: Structure and Function of an Enzyme of Historical and Molecular Biological Importance. **Protein Science**, v. 21, p. 1792–1807, 2012.

KAWAGUTI, Haroldo Y.; MANRICH, Eiric; SATO, Héliida H. Production of isomaltulose using *Erwinia* sp. D12 cells: Culture medium optimization and cell immobilization in alginate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 29, n. 3, p. 270–277, 2006.

KHAN, F. et al. A novel approach for identification of members of Enterobacteriaceae isolated from clinical samples. **Biology e Medicine**. v. 3, n. 2, p. 313–319, 2011.

KILIAN, M.; BULOW, P. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. I. Detection of bacterial glycosidases. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology**, v. 84 B, p. 245-251, 1976.

KIMURA, Keitarau; MORIMATSU, Kazuya; INAOKA, Takashi; YAMAMOTO, Kazutaka. Injury and recovery of *Escherichia coli* ATCC25922 cells treated by high hydrostatic pressure at 400-600 MPa. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 123, p. 698-706, 2017.

KONEMAN, Elmer W. et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 2 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

KONEMAN, Elmer W. et al. **Diagnóstico microbiológico**: texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2006.

KOSSEVA, Maria R. et al. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, p. 437-447, 2009.

KOURKOUTAS, Y. et al. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**. v. 21, p. 377–97, 2004.

LAURENTI, Elisa e GARCIA, Sandra. Eficiência de materiais encapsulantes naturais e comerciais na liberação controlada de probiótico encapsulado. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 16, n. 2, p. 107-115, 2013.

LIMA, Daniel Teixeira. **Efeito crioprotetor de lactose e glicose em células fúngicas imobilizadas em alginato de sódio como método de preservação de culturas**. 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Faculdade Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

LOTFIPOUR, Farzaneh; MIRZAEI, Shahla; MAGHSOODI, Maryam. Preparation and Characterization of Alginate and Psyllium Beads Containing *Lactobacillus acidophilus*. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 8. 2012.

LU, Yingjian; HUANG, Lijin; YANG, Tianbao; LV, Fengxia; LU, Zhaoxin. Optimization of cryoprotective medium to increase the viability of freeze-dried *Streptococcus thermophilus* by response surface methodology. **LWT-Food Science and Technology**, v. 80, p. 92-97, 2017.

MADIGAN, Michael T. et al. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MALAJOVICH, M.A. Imobilização de células em alginato. **Biotecnologia: ensino e divulgação**. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2009.

MARQUEZI, Marina C.; GALLO, Cláudio R.; DIAS, Carlos T. dos S. Comparação entre métodos para a análise de coliformes totais e *E. coli* em amostras de água. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, p. 291-296, 2010.

MARTIN-DEJARDIN, F. et al. A way to follow the viability of encapsulated *Bifidobacterium bifidum* subjected to a freeze-drying process in order to target the colon: Interest of flow cytometry. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.49, p.166-174, 2013.

McFARLAND STANDARD. For in vitro use only. **Dalynn Biologicals**. 2014.

3M DO BRASIL LTDA. Guia de Interpretação: 3M™ Petrifilm™ Placa para contagem de *E. coli* e Coliformes. USA, 2009.



3M DO BRASIL LTDA. Guia de Interpretação: 3M™ Petrifilm™ Placa para contagem de *Enterobacteriaceae*. USA, 2009.

MEIER, Gisele O. S. et al. Pesquisa, identificação e perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *Cronobacter* spp. em produtos destinados à alimentação infantil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 75, p. 1-9, 2016.

MENDES, Adriano A. **Seleção de Suportes e Protocolos de Imobilização de Lipases para a Síntese Enzimática de Biodiesel**. 2009. 194 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

MENDES, Adriano A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 5, p.831-840, 2011.

MLAGA, K. D. et al. *Nissabacter archeti* gen. nov., sp. nov., a new member of *Enterobacteriaceae* family, isolated from human sample at Archet 2 Hospital, Nice, France. **New Microbes and New Infections**. v. 17, p. 81-83, 2017.

MEZZATESTA, M.L.; GONA, F.; STEFANI *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. **Future Microbiology**, v.7, p. 887–902, jul 2012.

MILESSI, Thais S. dos S. **Imobilização de *Scheffersomyces stipitis* para obtenção de etanol de segunda geração em biorreator STR tipo cesta**. 2012. 148 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. Lorena, 2012

MOHAMAD, Nur R.; MARZUKI, Nur H. C.; BUANG, Nor A.; HUYOP, Fahrul; WAHAB, Roswanira A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, p. 205-220 2015.

MONTEIRO, Aydir C. M. **Identificação de micro-organismos presentes em hemoculturas de pacientes de unidades de terapia intensiva e avaliação dos *Staphylococcus coagulase negativa***. 2016. 69 f. Tese (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências de Botucatu. Botucatu, 2016.

MORETINI, Alex; MELO, Itamar Soares de. Formulação do fungo *Coniothyrium minitans* para controle do mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n.2, pp.155-161, 2007.

NAKAGAWA, Kei; IWAMOTO, Satoshi; NAKAJIMA, Mitsutshi; SHONO, Atsushi; SATOH, Kazumi. Microchannel emulsification using gelatin and surfactant-free coacervate microencapsulation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 278, n.1, p. 198-205, 2004.

NEDOVIC, Viktor. Et al. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, v.1, p.1806-1815, 2011.

NUALKAEKUL, Sawaminee; LENTON, Dominique; COOK, Michael T.; KHUTORYANSKIY, Vitaliy V.; CHARALAMPOPOULOS, Dimitris Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p.1281-1287, 2012.

OKAFOR, Nduka. **Modern Industrial Microbiology and Biotechnology**. Ed. Science Publishers, 2007.

OLIVEIRA, Tereza K. N. **Imobilização de microalgas *Chorella* sp em matriz alginato de Cálcio para tratamento de águas residuais**. 2014. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

OLIVEIRA, Walber F. et al. Utilização de diferentes meios de cultura para o isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frangos de corte procedentes de explorações industriais do Estado do Ceará, Brasil. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.99, p. 211-214, 2004.

PAOLI, Paolo. Biobanking in microbiology: From sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS Microbiology**, v. 29, p. 897–910, 2005.

PATERSON, David L. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. **The American journal of medicine**, v. 119, n. 6, p. 20-28, 2006.

PAULO, Elinalva M.; ASSIS, Sandra A.; SANTOS, Vera L. C. S. Polímeros constituídos por carboidratos utilizados no processo de microencapsulação de bactérias: uma revisão. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**. v. 9. n. 4, p. 185-191, 2009.

PELCZAR, Michael J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, Noel R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: MAKRON Books, 1996.

PEREIRA, Rafael M. **Técnicas de imobilização e estabilização de lipases obtidas a partir de diferentes fontes microbianas**. 2014. 30 f. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Química) – Instituto de Ciência e Tecnologia na Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2014.

PINHEIRO, Rodrigo R. et al. Avaliação da contaminação microbiana em produtos desinfetantes de uso geral. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v. 72, p. 170-174. 2013.

QUINN P.J., et al. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: **Artmed**, 2005.

REGLI, Anne D. e PAGÈS, Jean M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. **Front Microbiol.** v. 6, 2015.

RICE, Eugene W.; ALLEN, Martin J.; EDBERG, Stephen C. Efficacy of  $\beta$ -glucuronidase assay for identification of *Escherichia coli* by defined-substrate technology. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.1203-1205, 1990.

ROCHA, Daniela T. **Utilização de Redes Neurais Artificiais para a Classificação da Resistência a Antimicrobianos e sua relação com a presença de 38 genes associados a virulência isolados de amostras de *Escherichia coli* provenientes de frango de corte**. 2012. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias na área de Sanidade Avícola) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

SAEKI, Erika K.; FARHAT, Lúcio P.; PONTES Érica A. Eficiência dos crioprotetores glicerol e leite desnatado para o congelamento de micro-organismos. **Acta Veterinária Brasília**, v. 9, p. 195-198, 2015.

SANTANA, Larissa N. S. et. al. Estudo cinético da produção de etanol por *saccharomyces cerevisiae* imobilizado em alginato de sódio. In: VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. 2009, Uberlândia. **Anais... COBEQIC**, Uberlândia, 2009.

SANTOS, A. B.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 322-326, 2005.

SANTOS, Vidiany Aparecida Queiroz. **Avaliação de suportes para a imobilização de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 visando à produção de etanol e levana**. 2013. 118 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2013.

SCHETS, FM; NOBEL, PJ; STRATING, S; MOOIJMAN, KA; ENGELS, GB; BROUWER, A. Comparison of methods for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in water samples in the Netherlands. **RIVM** p.1-64, 2001.  
SEVDA, S.; RODRIGUES, L. Preparation of guava winw using immobilized yeast. **Journal Biochemical Techonology**, v. 5, n. 4, p. 819-822, 2014.

SEZONOV, Guennadi; JOSELEAU-PETIT, Danièle; D'ARI, Richard. *Escherichia coli* physiology in Luria Bertani Broth. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 8746–8749, Dec. 2007.

SHINDE, Tanvi. et al. Co-extrusion Encapsulation of Probiotic *Lactobacillus acidophilus* Alone or Together with Apple Skin Polyphenols: Na Aqueous and Value-Added Delivery System Using Alginate. **Journal Food Bioprocess Technology**, v. 7, p. 1581-1596, 2014.

SHU, Guowei; WANG, Zhuo; CHEN, Li; WAN, Hongchang; CHEN, He. Characterization of freeze-dried *Lactobaccilus acidophilus* in goat milk power and

tablet: Optimization of the composite cryoprotectants and evaluation of storage stability at different temperature. **LWT**. v. 90, p. 70-76, 2018

SILVA, Francenya Kelley Lopes da. **Produção de quitinase por *Paenibacillus illinoisensis* imobilizados em matriz de alginato**. 2018. 42 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Goiânia, 2018.

SILVA, Neusely; JUNQUEIRA, Valéria C. A.; SILVEIRA, Neliane F. A., TANIWAKI, Marta H.; SANTOS, Rosana F.S.; GOMES, Renato A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3ª Ed. São Paulo: Varela, 2007.

SOLA, Marília C. et al. Manutenção de microrganismos: Conservação e Viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, n. 14, p. 1398-1418, 2012.

SONY, I.S.; POTTY, V.P. Biochemical Identification of Protease Producing Bacterial Isolates from Food Industries by Vitek 2 Compact System. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 2, p. 840-851, 2017.

TAGI, Seref. **beta-Glucuronidase assay for the detection of *Escherichia coli* in foods**. 2001. Dissertations and Master's Theses (Campus Access). University of Rhode Island. Island, 2001.

TEIXEIRA, Vânea F. T. et al. Ion exchange kinetics of magnetic alginate ferrogel beads produced by external gelation. **Carbohydrate polymers**, v. 111, p. 198-205, 2014.

TIANI, Kendra A.; YEUNG, Timothy W.; MCCLEMENTS, Julian D.; SELA, David A. Extending viability of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus johnsonii* by microencapsulation in alginate microgels. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. v. 68, p. 1-10, 2017.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRABELSI, Imen et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* immobilization in alginate coated with chitosan and gelatin on antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 84–89, 2014.

TRABULSI, Luiz R.; CAMPOS, Leila C.; **Generalidades sobre Enterobactérias**. In.: TRABULSI, L.R. et al. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

VARGAS, Pamela Oliveira. **Secagem de partículas de alginato de cálcio**. 2017. 95 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Campos dos Goytacazes, 2017.

VILELA, Alice; SCHULLER, Dorit; FAIA, Arlete M.; REAL, Manuela C. Redução da acidez volátil de vinho por células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em esferas de alginato-quitosano. **Revista Enologia**, p.38-42, 2012.

VILLENA, Martin J. M.; HERNÁNDEZ, Morales M. E.; LARA, Gallardo V. ; MARTÍNEZ, Ruiz M. A. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. **Ars Pharmaceutica**. v. 50, n. 1, p. 43-50, 2009.

VOS, Paul de; FAAS, Marijke M.; SPASOJEVIC, Milica, SIKKEMA, Jan. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**. v. 20, p. 292–302, 2010.

WENDHAUSEN JÚNIOR, R. **Estudo sobre utilização de crisotila como suporte de células de *Saccharomyces cerevisiae* para uso em processo contínuo de fermentação alcoólica e biorreduções**. 1998. 80p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

XU, Meng; BOURQUE, François G.; DUMONT, Marie J.; JABAJI, Suha. Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 cells and evaluation of their survival after freeze-drying, storage and under gastrointestinal conditions. **Journal of Food Engineering**. v. 168, p. 52–59, 2016.

ZIMMERMANN, Ana L. S. **Desenvolvimento e avaliação de micropartículas contendo microrganismos viáveis utilizados como bioinseticida**. 2001. 165 f. Tese (Doutorado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2001.

Zuidam, N.J. & Shimoni E. Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. In: Zuidam, N.J., Nedovic, V.A., (Eds.). **Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing**, *Springer*, p. 3–31, 2009.