

DESENVOLVIMENTO DE COMPRIMIDOS PROBIÓTICOS A BASE DE KEFIR DESIDRATADO POR SPRAY DRYER.

Larissa Costa de Carvalho (IC) e Isabela Rosier Olimpio Pereira (Orientadora)

Apoio PIBIC CNPq

RESUMO

O Kefir é um produto probiótico obtido a partir da fermentação dos grãos de Kefir em leite e composto por diferentes cepas de microorganismos. Tem como benefícios: estimulação do sistema imune, regularização do trânsito intestinal e redução de colesterol. O objetivo é desenvolver e estudar a estabilidade de comprimidos probióticos a base de kefir desidratado por spray dryer em 3 faixas de temperatura (-20, 5 e 25°C). Foram realizadas análises físicas, físico-químicas e microbiológicas do produto e o mesmo manteve-se dentro do desejável em relação aos aspectos físicos e físico-químicos por até 60 dias em todas as condições de temperatura avaliados e apresentou a seguinte composição (%m/m): 8,42±0,42 de umidade, 6,19±1,00 de lipídeos, 18,58±0,93 de proteínas, 53,83±1,54 de carboidratos, 12,49±0,03 de cinzas e 0,83±0,02 de acidez. Não houve variação considerável nos aspectos físicos: aspecto, peso médio, dureza, dimensões e desintegração). O aspecto limitante foi a estabilidade microbiológica. A contagem de bactérias lácticas inicial dos comprimidos foi de 6,32 log UFC/g. Os comprimidos mantidos em temperatura ambiente (25°C) apresentaram redução da contagem de bactérias lácticas a partir de 30 dias (4,24log UFC/g). Os comprimidos mantidos em -20°C apresentaram redução da contagem de bactérias lácticas a partir de 60 dias (5,29log UFC/g). Os comprimidos mantidos em 5°C, não apresentam alteração significativa ($p>0,05$) da contagem de bactérias lácticas durante os 60 dias do estudo (5,34log UFC/g). Conclui-se com este estudo que a melhor forma de armazenamento de comprimidos derivados de kefir em pó atomizado é em temperatura de refrigeração (5±3).

Palavras-chave: Kefir. Comprimidos. Spray dryer.

ABSTRACT

Kefir is a probiotic product obtained from the fermentation of Kefir grains in milk and is composed of different strains of microorganisms. Its main benefits are stimulation of the immune system, regularization of intestinal transit and cholesterol reduction. The objective is to develop a spray dryer dehydrated kefir tablets and study the stability of them about three different temperatures (-20, 5 e 25°C). The product obtained from the fermentation was submitted to drying in mini-spray dryer, physical, physical-chemistry and microbiological analyzes and remained stable in relation to physical and physical-chemistry analyzes until 60 days at all temperatures evaluated. The product showed (8,42±0,42)% of humidity, (6,19±1,00)% of lipids, (18,58±0,93)% of proteins, (53,83±1,54)% of carbohydrate, (12,49±0,03)% of ashes and (0,83±0,02)% of acidity. There wasn't considerable variation in relation of physical analyzes: aspect, average weight, hardness, friability, dimensions and desintegration. The limitant factor was the microbiological stability. The inicial bacterial count was 6,32 log UFC/g. Tablets kept at room temperature (25°C) showed a reduction of bacterial count from 30 days (4,24 log UFC/g). Tablets kept at -20°C showed a reduction from 60 days (5,29 log UFC/g). Tablets kept at 5°C, remained stable in relation of bacterial count for 60 days (5,34 log UFC/g). That study concludes that the best condition to store the dehydrated kefir tablets, to extended stability, it's in fridge temperature (5±3) °C.

Keywords: Kefir. Tablets. Spray dryer.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Problema de pesquisa

O kefir é um alimento potencialmente probiótico que tem origem histórica das montanhas do Cáucaso. Sua forma de apresentação mais comum é a de grãos gelatinosos que, quando inoculados em um meio de cultura como o leite, produz um leite fermentado acidificado que é levemente carbonatado e contém pequena quantidade de álcool, comumente chamado de kefir (ROSA et al., 2017) e composto por diferentes cepas de microrganismos que incluem leveduras, bactérias ácido-láticas e ácido-acéticas que estão aderidos a uma trama de polissacarídeos denominada Kefirano (ATALAR E DERVISOGLU, 2015). Muitos são os benefícios atribuídos ao consumo de Kefir, tais como melhora da digestão e tolerância à lactose, inibição do crescimento de tumores e de microrganismos patogênicos, regularização do trânsito intestinal, redução de colesterol, inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e modulação do sistema imune, incluindo alívio de alergia e asma. (GOLOWCZYC et al., 2011, ROSA et al., 2017, BOURRIE et al., 2016).

O kefir pode ser encontrado em diversos países. No Brasil ainda não há kefir nas indústrias, mas o produto vem conquistando adeptos em várias regiões do país. Sua preparação se dá em nível artesanal, e resulta em um produto com uma série de características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas, se restringindo a algumas famílias que passam as amostras e a ela vão adicionando leite para a sua fermentação e utilização. O cultivo de kefir não é uma tarefa muito prática diante da rotina da vida nas grandes cidades. Muitos consumidores preferem produtos mais práticos e rápidos, sem abrir mão da “saudabilidade”.

Mascarenhas (2012) avaliou a aceitação sensorial de bebida láctea à base de Kefir em comparação aos iogurtes comerciais e os resultados obtidos mostraram preferência ao iogurte comercial nos quesitos, resultando em uma menor aceitação do Kefir. Este resultado indica que o kefir pode não ter uma boa aceitação no mercado, porém, abre-se o campo para o desenvolvimento de produtos versáteis e alternativos com melhor aceitação junto aos benefícios probióticos do kefir.

Além da baixa aceitação e falta de praticidade, mencionadas anteriormente, outro desafio é a manutenção dos microrganismos vivos. A produção industrial de probióticos exige que estes microrganismos se mantenham estáveis e viáveis e desidratação de kefir pode aumentar o prazo de validade, reduzir custos de armazenamento, além de aumentar a praticidade na comercialização e utilização do produto.

A liofilização tem sido a técnica mais utilizada para desidratação de microrganismos (ATALAR; DERVISOGLU, 2015), mas é um processo muito caro, o que eleva o custo ao

consumidor (ORDÓÑEZ et al., 2005). Na indústria de laticínios a secagem em spray dryer é largamente empregada para a produção de ingredientes lácteos com custos de processamento comercialmente viáveis, apresentando custo de evaporação dez vezes inferior ao processo de liofilização (SCHUCK, 2013). Porém como é um método que utiliza aquecimento, pode reduzir a viabilidade dos microrganismos. Desse modo, deve-se utilizar de algumas estratégias para aumentar a sobrevivência dos microrganismos (PETROVIC et al., 2007).

1.2. Justificativa

A elaboração e caracterização de um comprimido a base de kefir se justifica pela demanda de mercado por produtos inovadores, práticos e que atendam às necessidades de saúde da população. Em uma pesquisa realizada pela FIESP/IBOPE (BRASIL FOODTRENDS 2020, 2010) foram avaliadas as quatro principais tendências observadas para o consumo de alimentos no Brasil. “Conveniência e Praticidade” é o quesito mais importante para 34% da população. O quarto quesito mais importante foi “Saudabilidade e Bem-estar”, para 21% da população. As tendências de “saudabilidade e bem-estar” originam-se na busca de um estilo de vida mais saudável. O consumo de Kefir desidratado representa “Saudabilidade e Bem-estar”, além de “Conveniência e Praticidade” ao consumidor que não precisa realizar a fermentação caseira do produto. Com isso, observa-se que o suplemento em forma de comprimidos possui grandes possibilidades futuras no mercado brasileiro.

O mercado global de suplementos alimentícios probióticos, de €4 bilhões (US\$ 4,30 bilhões), teve um crescimento de 9% em 2016 e uma estimativa de crescimento de 38% entre 2016 e 2021. Além disso, o crescimento dos suplementos probióticos ultrapassará todas as outras categorias de suplementos alimentares. (MILK POINT, 2016) A crescente conscientização dos consumidores com relação à saúde intestinal teve um importante papel no crescimento desses ingredientes.

O relatório Global Industry Analysis, feito pelo Transparency Market Research (TMR) destacou as áreas de interesse para probióticos são lácteos, cereais, produtos fermentados de carne, alimentos desidratados, entre outros. “A demanda de probióticos para produtos lácteos deverá alcançar US\$ 32,2 bilhões em 2018, com uma taxa composta de crescimento anual (CAGR) de 6,8% de 2013 a 2018”. (MILK POINT, 2013)

1.3. Objetivos

O objetivo deste trabalho é desenvolver e estudar a estabilidade de comprimidos a base de kefir desidratado por spray dryer.

1.3.1 Objetivos Específicos

- 1) Fermentar o kefir em leite desnatado em pó reconstituído.
- 2) Desidratar o produto obtido por spray dryer.
- 3) Comprimir o pó de kefir.
- 4) Embalar a vácuo os comprimidos.
- 5) Fazer controle físico-químico e microbiológico dos comprimidos.
- 6) Estudar a estabilidade físico-química e microbiológica dos comprimidos.

2. Referencial teórico

Leite fermentado é o produto resultante da fermentação do leite por fermentos lácteos próprios, segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2007). Esse tipo de alimento inclui produtos como iogurte, leite cultivado ou fermentado, leite acidófilo, kefir, kumys e coalhada (BRASIL, 2000). Kefir é um leite fermentado, ácido, levemente alcoólico, produzido artesanalmente a partir de grãos que contêm uma população relativamente estável de micro-organismos (DIAS, 2016). O processo fermentativo gera uma série de compostos que conferem sabor e aroma característicos ao kefir, além de substâncias bioativas, responsáveis por propriedades nutraceuticas (AHMED et al., 2013).

O kefir é resultante da fermentação do leite com grãos de kefir ou de uma cultura anterior preparada dos grãos (“cultura mãe”) (GARROTE et al., 1998). Comparado ao iogurte, o kefir além de possuir uma escala maior e mais diversificada de micro-organismos viáveis em sua cultura inicial, também apresenta um nível de atividade da β -galactosidase 60% mais elevado, contribuindo para um aumento significativo da digestão da lactose do leite (HERTZLER & CLANCY, 2003).

Os grãos de kefir são massas gelatinosas medindo de 3 a 35 mm de diâmetro, possuem uma aparência semelhante à couve-flor, apresentando forma irregular e coloração amarelada ou esbranquiçada. Nesta estrutura, existe uma associação simbiótica de leveduras, bactérias ácido-láticas, bactérias ácido-acéticas, entre outros microorganismos, envoltas por uma matriz de polissacarídeos referidos como kefiran (OTLES e CAGINDI, 2003).

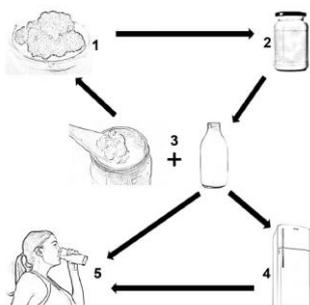


Figura 1. Produção doméstica de kefir. (1) Separação dos grãos de kefir. (2) Adição de leite aos grãos em um frasco semi-tampado em temperatura ambiente para fermentação de 10 às 24h. (3) Filtração e separação dos grãos. Possível adição dos grãos de kefir ao leite fresco para iniciar uma nova fermentação (1,2). (4) O kefir pode ser refrigerado (4°C). (5) O kefir está pronto para beber. Fonte: Rosa et al., (2017).

O kefir é comumente fermentado em leite integral, mas o leite desnatado (GOLOWCZYC et al., 2011) têm se mostrado mais eficiente como microencapsulante para secagem de culturas probióticas por spray-dryer.

Em testes preliminares realizados por nosso grupo de pesquisa, avaliaram-se concentrações diferentes de leite em pó desnatado reconstituído (12, 25 e 50%) no preparo do produto fermentado por kefir e posterior secagem por spray dryer. Os pós obtidos tiveram seu rendimento, umidade e sobrevivência de microrganismos avaliados. A concentração inicial de sólidos em 12% se mostrou a melhor, tendo favorecido o processo fermentativo e uma maior eficiência de secagem por spray dryer. Os resultados mostraram elevada sobrevivência de bactérias lácticas cultivadas em meio MRS em microaerofilia na ordem de 107 UFC/g do pó obtido, porém leveduras (PDA em meio ácido) não sobreviveram (SANTOS, T.C.; SILVA, B.B.C.; PEREIRA, I.R.O., 2017)

Desse modo, considerando que a sobrevivência de bactérias lácticas probióticas é preservada após secagem de kefir por spray dryer fermentado em leite desnatado reconstituído a 12%, propõe-se o desenvolvimento de um comprimido a base de kefir que possa ser usado como suplemento, e dessa forma, mascarar a baixa palatabilidade e sendo ao mesmo tempo prático e saudável.

3. Procedimentos metodológicos

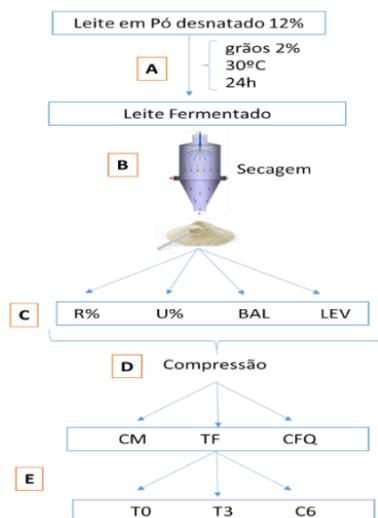


Figura 2 – Visão geral da metodologia proposta. O kefir será fermentado em leite em pó reconstituído a 12 % (A). O leite fermentado será seco por spray dryer em 3 lotes de 2kg (B). Após

secagem, os 3 lotes serão avaliados (**C**) quanto a rendimento (R%), umidade (%U), contagem de bactérias lácticas (BAL) e leveduras (LEV). O pó obtido será comprimido (**D**) e então submetido ao estudo de estabilidade, onde serão realizado o controle microbiológico (CM), testes físicos (TF) e controle físico-químico nos tempos 0 (T0), 30 dias após compressão (T3) e 60 dias após compressão (T6) (**E**).

3.1. Local de realização do projeto

As etapas de fermentação, secagem, análises físico-químicas e microbiológicas serão realizadas no laboratório de Bromatologia da Universidade Presbiteriana Mackenzie. As etapas de formulação, granulação e compressão para obtenção dos comprimidos e os testes físicos de controle de qualidade dos comprimidos serão realizadas no laboratório Semi-Industrial de Farmácia da Universidade Presbiteriana Mackenzie.

3.2. Origem, congelamento e ativação dos grãos de kefir

Os grãos de kefir utilizados foram obtidos por doação de pessoas que fazem cultivo doméstico na cidade de São Paulo e vêm sendo cultivados no laboratório de Bromatologia da Universidade Presbiteriana Mackenzie desde 2016. Eventualmente, os grãos são congelados a -20°C em leite desnatado por até 2 meses. Para reutilização dos grãos congelados, eles deverão ser ativados a 5% (m/m) em 1 L de leite desnatado UHT (concentração de sólido 10%, m/m) por 24h a 22°C. Após este tempo, os grãos serão coados em peneira fina e submetidos a uma nova fermentação do mesmo modo.

3.3. Fermentação

Após ativação, os grãos (2%, m/m) serão utilizados para fermentação em leite em pó desnatado reconstituído com concentração de sólidos 12% (m/m) em água potável, em 3 lotes de 2kg. A fermentação ocorrerá em estufa a 30°C por 24 horas. Após este período, os grãos de kefir serão removidos do leite fermentado com uma peneira e pesados para avaliação do crescimento. O leite fermentado será resfriado a 9°C antes da secagem por atomização. Uma alíquota de 1g será retirada para análise de umidade.

3.4. Secagem por spray dryer (atomização)

A secagem será realizada em um mini spray dryer (LabMaq do Brasil MSD1.0) a um fluxo de 0,5L/h, temperaturas de alimentação, entrada e saída de 9, 135 e 90°C, respectivamente, seguindo parâmetros publicados por Atalar e Dervisoglu (2015). Adicionalmente o frasco receptor do pó será resfriado por imersão em banho de gelo durante todo o período de secagem. Foi observado em testes preliminares que esse passo de resfriamento é essencial para uma boa sobrevivência dos microrganismos. Uma amostra do leite fermentado em pó produzido será retirada para análise do teor de umidade e análise

microbiológica. O leite fermentado em pó será armazenado por no máximo 24h em dessecador (para manutenção do baixo teor de umidade pretendido) antes da compressão.

3.4.1 Teor de umidade e rendimento do pó obtido após secagem por atomização

O teor de umidade do fermentado líquido inicial e do pó obtido serão avaliados utilizando 0,5g de amostra (Figura 1, D) em uma balança de umidade Shimadzu (MOC 120H). O rendimento será calculado após pesagem do pó obtido em balança semi-analítica pela seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento(\%)} = \frac{(\text{massa de kefir em pó obtido após secagem} - \text{teor de umidade \%}) \times 100}{(\text{teor de sólidos inicial\%} = 100 - \text{teor de umidade inicial})}$$

3.5. Compressão do pó

Para compressão, será testada inicialmente a formulação da tabela 1. Em caso de o produto gerado não aderir de forma adequada para a formação de um comprimido, a formulação poderá ser alterada.

Tabela 1 – Formulação do pó utilizado para compressão

Componente	% (m/m)
Leite fermentado em pó	90
Dióxido de silício coloidal	5
Estearato de magnésio	5

Usado como deslizante, o dióxido de silício coloidal AEROSIL® melhora a uniformidade da dosagem (EVONIK, 2015). Já estearato de magnésio é usado como lubrificante para diminuir a fricção entre os grânulos (LAMOLHA, M. A.; SERRA, C. H., 2007). Os componentes serão misturados manualmente para a obtenção de 3 lotes de 200g de comprimido e adicionados em um mini-granulador Lemaq® para homogeneizar tamanho de partícula. Após granulação o pó será comprimido em uma compressora rotativa Lemaq® mini express para produção dos comprimidos de aproximadamente 300mg do produto final. Os comprimidos serão embalados em uma seladora a vácuo em porções de 30 comprimidos protegidos da luz. Uma primeira amostra será retirada para análises microbiológicas, físicas e físico-químicas compondo o tempo 0 do estudo de estabilidade. As demais serão divididas em 2 partes. Uma parte será armazenada em refrigeração (2-8°C) e outra em temperatura ambiente (15-30°C) pelo período de 2 meses conforme protocolo de estudo de estabilidade.

3.6. Estudo de estabilidade

Será realizado de acordo com o Guia para realização de estudo de estabilidade da ANVISA (BRASIL, 2005). A tabela 2 mostra a proposta a ser seguida para o estudo de estabilidade.

Tabela 2 – Proposta de estudo de estabilidade

Tempo (dias)			
T (°C)	0	30	60
-20±2	Análises Físicas, Microbiológicas e Bromatológicas.		
5±3			
25±2			

3.7. Análise microbiológica para avaliação da sobrevivência dos microrganismos do kefir após a secagem e após compressão

Para avaliação da viabilidade das bactérias ácido-láticas (BAL) após o processo de secagem (Figura 1, D) será feita a técnica de contagem baseada nas Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL), de acordo com o procedimento descrito na literatura. Uma avaliação inicial será feita imediatamente após o processo de secagem e outra após a compressão. A contagem das BAL será realizada em condições de microaerofilia em meio MRS ágar suplementado com nistatina e cicloheximida (50 mg/mL de cada) para suprimir o crescimento de leveduras.

1 g de cada amostra será diluída em 9 mL de salina peptonada estéril (0,1% peptona, 0,8% NaCl) prosseguindo com diluições seriadas apropriadas para cada amostra em duplicata. As amostras diluídas serão semeadas em placas de Petri contendo o meio de cultura apropriado. Todas as culturas serão incubadas a 30°C por 3 dias para posterior contagem. A avaliação do crescimento será feita através da contagem do número de células viáveis.

3.8. Análises Físico-Químicas

As análises de Umidade, Cinzas, Proteínas, Lipídeos e Acidez serão realizadas em duplicata para cada lote, em cada tempo (T0, T30 E T60) e temperatura (-20, 5 e 25°C) do estudo de estabilidade.

A metodologia utilizada para as análises bromatológicas seguirá as normas analíticas segundo métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2008).

3.9. Testes Físicos para comprimidos

Serão realizadas as análises de aspecto, peso médio, dimensões, dureza, friabilidade e desintegração segundo a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). O aspecto será avaliado para verificar se a aparência do comprimido muda durante o tempo de armazenamento. Peso médio e dimensões permitem verificar se as unidades de um mesmo lote apresentam uniformidade. Dureza e friabilidade visam demonstrar a resistência dos comprimidos à ruptura provocada por quedas ou fricção. O teste de desintegração permite verificar se comprimidos e cápsulas se desintegram dentro do limite de tempo especificado. (BRASIL, 2010).

3.9.1 Aspecto

O comprimido será observado e será feita a descrição de sua aparência.

3.9.2 Peso médio

Serão pesados em balança analítica, individualmente, 20 comprimidos e determinado o peso médio e desvio padrão. Pode-se tolerar não mais que duas unidades fora do limite de variação de 5% do peso de cada unidade em relação ao peso médio. Nenhuma unidade poderá estar acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas.

3.9.4 Dimensões

Será realizada com o auxílio de um paquímetro para medida de altura e diâmetro de 5 unidades. O resultado do teste é informativo.

3.9.5 Dureza

O teste será realizado com 10 comprimidos individualmente, eliminando qualquer resíduo superficial antes de cada determinação. Será utilizado um Durômetro Marconi® 298AT. Nenhuma unidade deve apresentar dureza inferior a 30 N. O resultado do teste é informativo.

3.9.6 Friabilidade

Serão pesados 20 comprimidos e introduzidos no Friabilômetro Marconi® MA791. O teste será realizado com velocidade de 25 rotações por minuto por 4 minutos. Decorrido o prazo, qualquer resíduo de pó da superfície dos comprimidos é removido e são pesados novamente. Nenhum comprimido pode apresentar-se, ao final do teste, quebrado, lascado, rachado ou partido. São considerados aceitáveis os comprimidos com perda igual ou inferior a 1,5% do seu peso.

3.9.7 Desintegração de cápsulas e comprimidos

Será utilizado um Desintegrador Marconi® MA792 contendo um copo de 1000 mL dentro da cuba, posicionado de forma que o cesto tenha um movimento ascendente e

descendente livre a temperatura (37°C). 6 comprimidos serão colocados no cesto com peso de acrílico para medida do tempo de desintegração. O limite de tempo estabelecido como critério geral para a desintegração de comprimidos não revestidos é de 30 minutos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

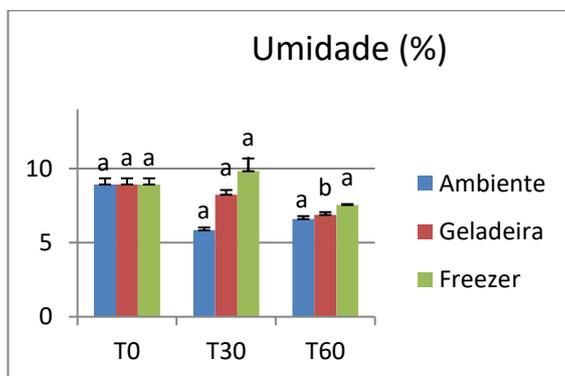
4.1. Estabilidade físico-química

As análises físico-químicas foram realizadas em duplicadas, onde apenas as análises de umidade e acidez foram realizadas em períodos diferentes para estudo de estabilidade, sendo em T0, T30 e T60, e as demais foram realizadas apenas durante T0.

Tabela 3 – Porcentagem das análises bromatológicas realizadas logo após a compressão do pó obtido (T0).

COMPOSIÇÃO CENTESIMAL MÉDIA DO COMPRIMIDO DE KEFIR (g/100g)					
Umidade	Cinzas	Lipídeos	Proteínas	Carboidrato	Acidez (ácido láctico)
8,91±0,42	12,49±0,03	6,18±0,99	18,58±0,93	53,83±1,54	0,82±0,02

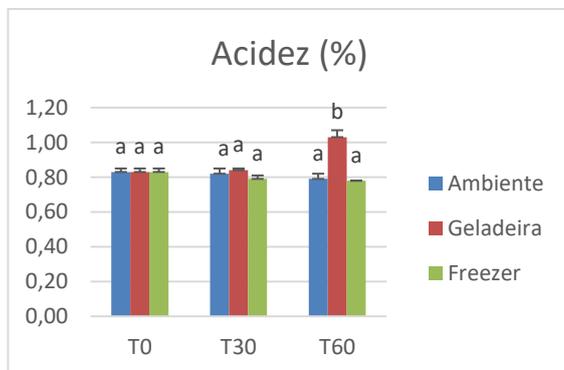
Gráfico 1 – Variação do teor de umidade ao longo do tempo (T0, T30 E T60) das amostras mantidas em -20, 5 e 25°C. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa de T30 e T60 em relação ao T0 ($p < 0,05$)



Segundo Castro, Fritzen e Sant'anna (2012), a umidade residual de pós probióticos deve ser igual ou inferior a 4%. A umidade inicial está acima do ideal, mas manteve-se estável ao longo do tempo nas 3 temperaturas testadas, exceto após 60 dias quando em temperatura ambiente, pois houve redução do teor de umidade (Gráfico 1) que pode ser decorrente de variação da umidade do ambiente.

O gráfico 2 mostra que a acidez foi estável, exceto em 60 dias para temperatura ambiente indicando leve atividade fermentativa, mas não comprometeu a estabilidade microbiológica do produto nesta condição.

Gráfico 2 – Teor de acidez (%) ao longo do tempo (T0, T30 E T60) das amostras mantidas em -20, 5°C e 25°C. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa de T30 e T60 em relação ao T0 ($p < 0,05$).



4.2. Testes físicos

Todos os parâmetros foram submetidos à análises em T0, T30 e 60 em triplicatas, para análise do estudo de estabilidade em -20, 5 e 25°C.

4.2.1 Aspecto

Todos os comprimidos avaliados durante T0, T30 e T60 apresentaram aspecto uniformes, íntegros, arredondados, coloração levemente amarelada, livre de impurezas e odor característico. Não houveram mudanças significativas visuais entre as diferentes amostragens.



Figura 3 – Comprimidos logo após a compressão (T0).



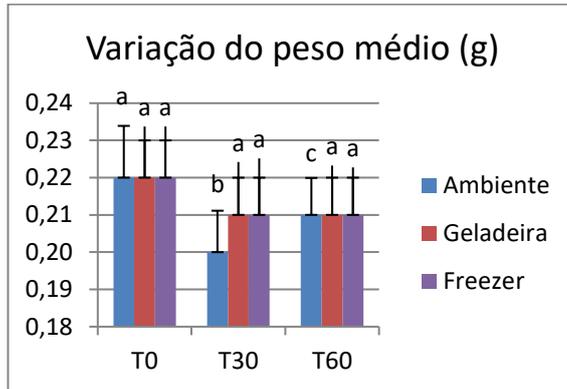
Figura 4 – Comprimidos 30 dias após a compressão (T30).



Figura 5 – Comprimidos 60 dias após a compressão (T60).

4.2.2 Peso médio

Gráfico 3 – Variação do peso médio (g) ao longo do tempo (T0, T30 E T60) das amostras mantidas a -20°, 5°C e 25°C. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa de T30 e T60 em relação ao T0 ($p < 0,05$).



As amostras mantidas à -20 e 5°C mantiveram-se estáveis ao longo do estudo (gráfico 3). A partir de T30, nas amostras mantidas em temperatura ambiente, houve redução de peso, mas não ultrapassou o limite dos critérios estabelecidos no item 3.9.2 que seguiu critério farmacopéico. Segundo a RDC 318/19, os testes físicos não são critérios de reprovação. Não há regulamentação para estudo de estabilidade de suplemento alimentar.

4.2.3 Dimensões

Gráfico 4 – Variação da altura (mm) ao longo do tempo (T0, T30 E T60) das amostras mantidas a -20°, 5°C e 25°C. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa de T30 e T60 em relação ao T0 ($p < 0,05$).

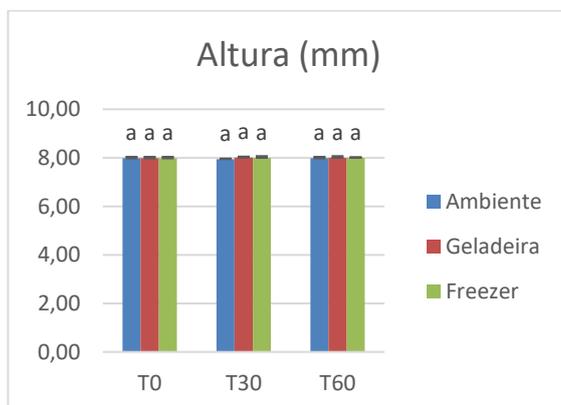
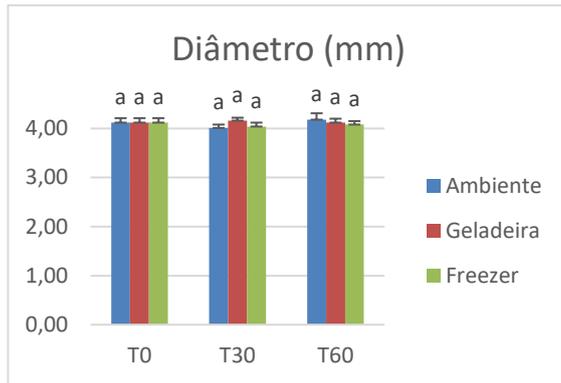


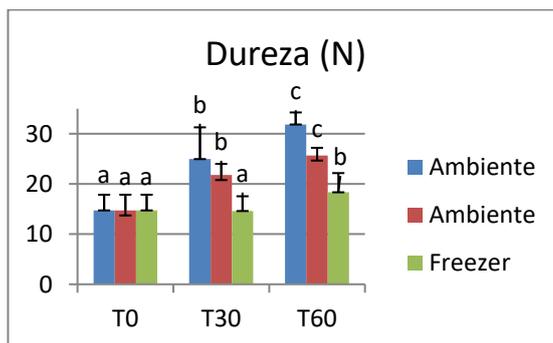
Gráfico 5 – Variação do diâmetro (mm) ao longo do tempo (T0, T30 E T60) das amostras mantidas a -20°C, 5°C e 25°C. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa de T30 e T60 em relação ao T0 ($p < 0,05$).



Não foram observadas diferenças significativas das dimensões do comprimido durante estudo ($p > 0,05$), logo a conformação dos comprimidos se manteve uniforme e estável durante o tempo decorrido.

4.2.4 Dureza

Gráfico 6 – Variação da dureza (N) ao longo do tempo (T0, T30 E T60) das amostras mantidas a -20°C , 5°C e 25°C . Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa de T30 e T60 em relação ao T0 ($p < 0,05$).



Os resultados da análise de dureza (gráfico 6) referente às amostras em temperatura ambiente e geladeira apresentaram diferenças significativas em todos os períodos avaliados, as comparações entre T0 e T30, T0 e T60, T30 e T60 apresentaram $p < 0,05$. As amostras mantidas no freezer não demonstram diferenças significativas com o decorrer do tempo até 30 dias após compressão, com $p = 0,91$, porém após 60 dias apresenta $p = 0,02$, indicando melhor estabilidade relacionada à dureza em freezer, porém apenas no período de 30 dias.

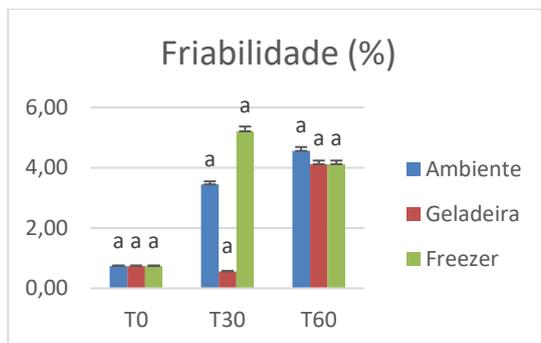
É válido ressaltar que os resultados foram abaixo do esperado (mínimo 30N), mas estes dados têm caráter apenas descritivo, não havendo limite mínimo e máximo descritos na literatura, desde que enquadrados nos limites de desintegração.

4.2.5 Friabilidade

Ao final do teste, nenhum comprimido apresentou-se lascado, quebrado ou rachado. As massas individuais dos comprimidos se enquadram no parâmetro aceitável, porém ao

realizar o teste em todos os tempos, com exceção da amostra em T30 refrigerada à 5°C que houve apenas 0,56%, houve perda maior que 1,5% da massa inicial (gráfico 7).

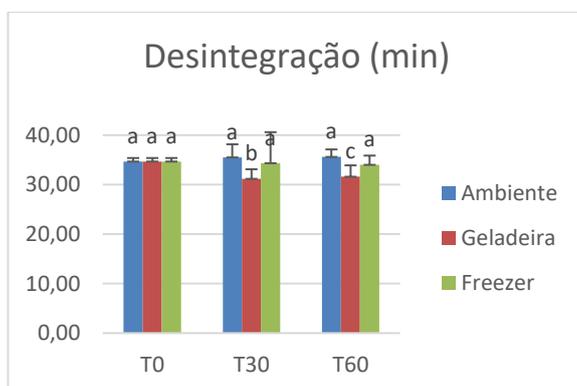
Gráfico 7 – Porcentagem de perda de massa (%) ao longo do tempo (T0, T30 E T60) das amostras mantidas a -20°C, 5°C e 25°C. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa de T30 e T60 em relação ao T0 ($p < 0,05$).



4.2.6 Desintegração de cápsulas e comprimidos

Os tempos de desintegração de comprimidos (gráfico 8) estão acima do parâmetro máximo para medicamentos que, segundo Farmacopéia Brasileira (2010), para comprimidos não revestidos é de 30 minutos. Este resultado é esperado, pois o kefir é a base de leite que contém 18% de proteína em sua composição (tabela 3), principalmente caseína coagulada em meio ácido pela fermentação, que é uma proteína insolúvel, que precisará do pH ácido do estômago e enzimas digestivas para se solubilizar (DUARTE, A. et al., 1998). De acordo com ANVISA (2018), é necessária a comprovação do benefício a partir da demonstração da sobrevivência às condições do trato digestório humano. O mais importante é que não houve alteração significativa do tempo de desintegração ao longo do tempo nas 3 temperaturas testadas, indicando estabilidade do produto.

Gráfico 8 – Variação do tempo de desintegração (min) ao longo do tempo (T0, T30 E T60) das amostras mantidas a -20°, 5°C e 25°C. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa de T30 e T60 em relação ao T0 ($p < 0,05$).



4.3. Análises microbiológicas

Foi realizada a contagem de bactérias ácido-láticas nas diferentes etapas de produção dos comprimidos, para avaliar se existem etapas que influenciam em perda relevante. A tabela compara os resultados da contagem do pó logo após atomização, do pó logo após mistura com os excipientes e do pó proveniente da trituração do comprimido final.

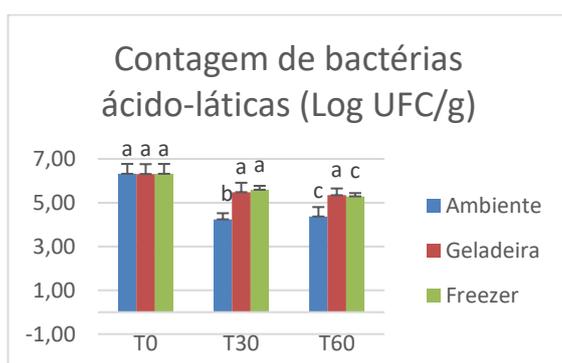
Tabela 4 – Contagem de bactéria ácidos láticas em três etapas da produção dos comprimidos.

Contagem de Bactérias Ácido-Láticas (Log UFC/g)	
Amostra	BAL
Atomização(A1)	^a 6,43±0,27
Excipientes(A2)	^a 5,96±0,31
Compressão(A3)	^a 6,32±0,45

Segundo a tabela 4 foi avaliado que as etapas de mistura dos excipientes e compressão do pó não interferem negativamente na contagem de microorganismos, apresentando $p=0,07$ entre A1 e A2, $p=0,54$ entre A2 e A3 e $p=0,55$ entre A1 e A3.

Foi realizada também a contagem de bactérias ácido-láticas e leveduras dos comprimidos nos períodos de 0, 30 e 60 dias após compressão e mantidos em temperatura ambiente, geladeira e freezer. Não houve contagem de leveduras em nenhuma das amostragens.

Gráfico 9 – Logarítmo da contagem de bactérias ácido-láticas presentes em comprimidos mantidos em temperaturas de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, $5\pm 3^{\circ}\text{C}$, $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e em T0, T30 e T60.



A sobrevivência de bactéria ácido-láticas em temperatura ambiente não foi favorável, pois houve perda significativa logo nos primeiros trinta dias ($p=0,006$). A contagem de bactérias láticas dos que foram mantidos em geladeira permaneceu estável pelos 60 dias de avaliação. Já a sobrevivência dos microorganismos referente às amostras em freezer manteve-se estável nos primeiros 30 dias ($p=0,09$), porém em 60 dias houve perda da estabilidade.

Todas as amostras foram mantidas em recipiente fechado a vácuo e dentro de um dessecador. No momento a realizar as análises de T60 das amostras a -20°C , foi observado que o recipiente havia perdido o vácuo, fato este que pode ter sido o influenciador para perda de estabilidade microbiológica (gráfico 9).

Segundo o Regulamento Técnico de identidade e qualidade de leites fermentados (BRASIL, 2007), as quantidades de BAL e leveduras para kefir devem ser, respectivamente, 107 e 104 UFC/g, porém os resultados obtidos no presente estudo indicam que o produto não se enquadra nos parâmetros, onde as leveduras não sobrevivem após atomização do leite fermentado e as BAL atingiram contagem máxima de 106 UFC/g. Desse modo, este produto não pode ser denominado kefir, mas não impede de ser considerado probiótico. Segundo a RDC 241/18, um produto probiótico deverá comprovar estabilidade, segurança e eficácia durante todo o prazo de validade do produto, porém não impõe limite mínimo para a contagem dos microrganismos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O produto derivado de kefir manteve-se dentro do desejável em relação aos aspectos físicos e físico-químicos por até 60 dias em todas as condições de temperatura avaliados, exceto para friabilidade. O aspecto limitante é a estabilidade microbiológica. Os comprimidos mantidos em temperatura ambiente (25°C) apresentaram redução da contagem de bactérias lácticas a partir de 30 dias. Já os comprimidos mantidos em -20°C apresentaram redução da contagem de bactérias lácticas a partir de 60 dias de validade. As amostras mantidas em 5°C mantiveram-se estáveis em relação a contagem de bactérias lácticas durante os 60 dias do estudo, sendo, portanto, considerada a forma mais estável.

Conclui-se com este estudo que, para estabilidade prolongada, a melhor maneira de armazenamento de comprimidos a partir da de pó atomizado de leite fermentado por kefir é em temperatura de refrigeração ($5\pm 3^{\circ}\text{C}$).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, Z.; WANG, Y.; AHMED, A.; KHAN, S.T.; NISA, M.; AHMAD, H.; AFREEN, A. Kefir and Health: A Contemporary Perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 53, n. 5, p. 422-434, 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2010.540360>>. Acesso em: 15 fev. 2016.

ATALAR I, DERVISOGLU M. Optimization of spray drying process parameters for kefir powder using response surface methodology. **Food Science and Technology** 60. 2015, p. 751-757.

BOURRIE BCT, WILLING BP and COTTER PD. The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir. **Frontiers in Microbiology**, v.7, Article 647, 2016.

BRASIL FOOD TRENDS 2020, PP de População - São Paulo: Fiesp/Ital, 2010. Disponível em: <http://www.ital.sp.gov.br/tecnolat/anais/tl230513/Arquivos/Brasil%20Food%20Trends%202020>
HYPERLINK
"http://www.ital.sp.gov.br/tecnolat/anais/tl230513/Arquivos/Brasil%20Food%20Trends%202020.pdf"0.pdf. Acesso em 16 de março de 2017.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Anvisa, 2010, v.1, 545p.

BRASIL. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 46, DE 23 DE OUTUBRO DE 2007. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/instru%C3%87%C3%83o-normativan%C2%BA-46-de-23-de-outubro-de-2007.pdf>. Acesso em 13 de fevereiro de 2017.

BRASIL. **RDC Nº 02, DE 07 DE JANEIRO DE 2002. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional ou de Saúde**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_02_2002_COMP.pdf/68a25113-35e2-4327-a75f-ae22e714ca7c>. Acesso em 16 de fevereiro de 2017.

BRASIL. **RDC Nº 318, DE 6 DE NOVEMBRO DE 2019**. Estabelece os critérios para a realização de Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências.. Disponível em: < <http://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-318-de-6-de-novembro-de-2019-226513805>>. Acesso em 01 de março de 2020.

BRASIL. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA RDC Nº 241, DE 26 DE JULHO DE 2018**. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos.

Disponível em: < http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379910/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-241-de-26-de-julho-de-2018-34379900>. Acesso em 01 de março de 2020.

BRASIL. **Resolução - RE nº 1 de 29 de Julho de 2005**. Brasília: ANVISA.

CAGINDI, O.; OTLES, S. Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. **Pakistan Journal of nutrition**, Turquia,2003,v. 2, n.2, p. 54-59.

CASTRO-CISLAGHII, F.P.; FRITZEN-FREIREII, C.B.; SANT'ANNA, E.S. Potencial do soro de leite líquido como agente encapsulante de Bifidobacterium Bb-12 por spray drying: comparação com goma arábica. **RevistaCiência Rural**, v.42, n.9, p.1694-1700, 2012.

DUARTE, A. et al. PROPRIEDADES EMULSIFICANTES E SOLUBILIDADE DA CASEÍNA BOVINA E DE SEUS HIDROLISADOS TRÍPTICOS: 1. EFEITO DO PH E DO TEMPO DE HIDRÓLISE. **Ciênc. Technol. Aliment.**, Campinas, v.18, n.3, p.295-302, Aug.1998. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611998000300008&lng=en&nrm=iso. Acessado em 01 Mar. 2020.

EVONIK. AEROSIL® and AEROPERL® Colloidal Silicon Dioxide for Pharmaceuticals. Alemanha, 2015 Disponível em: <http://www.aerosil.com/sites/lists/RE/DocumentsSI/TI-1281-AEROSIL-and-AEROPERL-Colloidal-Silicon-Dioxide-for-Pharmaceuticals-EN.pdf> Acesso em 20 de março de 2018.

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

GARROTE GL, ABRAHAM AG, DE ANTONI GL. **Chemical and microbiological characterisation of kefir grains**. J Dairy Res.Nov, 2001.

GOLOWCZYC MA, GEREZ CL, SILVA J, ABRAHAM AG, DE ANTONI GL, TEIXEIRA P. **Survival of spray-dried Lactobacillus kefir is affected by different protectants and storage conditions**. Biotechnol Lett,2011 p.681–686.

HERTZLER, S. R.; CLANCY, S. M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal of American Dietetic Association**, 2003, v.153, n. 5, p. 582-587.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020p. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016319/analisedealimentosial_2008.pdf Acesso em: 15 dez. 2008.

LAMOLHA, M. A.; SERRA, C.H. Avaliação das propriedades de fluxo dos granulados e dissolução de comprimidos de hidroclorotiazida 50 mg obtidos por granulação úmida. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 43, n. 3, jul./set., 2007

MASCARENHAS, M. A. C. *QualiKefir: Avaliação da Qualidade Físico-Química e Sensorial em Produtos derivados de Kefir, Leite e Iogurte Líquido Natural*. 2012. Tese (Mestrado em gestão da qualidade e segurança alimentar) - Instituto politécnico de Leiria, Peniche, 2012. Disponível em: <file:///C:/Users/Gildo/Downloads/Mestrado%20GQSA alimentar_Marisa_Mascarenhas.pdf> Acesso em 27 de março de 2018.

MILK POINT, 2013. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/mercado-global-de-probioticos-crescera-68-anualmente-ate-2018-82177n.aspx>. Acesso em 25 de outubro de 2017.

MILK POINT, 2016. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/industria/cadeia-do-leite/giro-de-noticias/suplementos-probioticos-estao-crescendo-em-um-mercado-global-de-40-bilhoes-de-euros-102973n.aspx> HYPERLINK "https://www.milkpoint.com.br/industria/cadeia-do-leite/giro-de-noticias/suplementos-probioticos-estao-crescendo-em-um-mercado-global-de-40-bilhoes-de-euros-102973n.aspx"-bilhoes-de-euros-102973n.aspx. Acesso em 25 de outubro de 2017.

ORDÓÑEZ, J.A. et al. **Tecnologia de Alimentos – Componentes dos Alimentos e Processos**; trad. Fátima Murad – Porto Alegre: Artmed, 2005. v. 1. 294 p.

PETROVIC T, NEDOVIC V, DIMITRIJEVIC-BRANCOVIC S, BULGARSKI B, LACROIX C. **Protection of Probiotic Microorganisms by microencapsulation**. CI and CEQ 133) 169-174, 2007.

ROSA DD, DIAS MMS, GRZES´KOWIAK LM, REIS SA, CONCEIÇÃO LL AND PELUZIO MCG. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. **Nutrition Research Reviews**, 2017, p.82-96.

SANTOS T.C., SILVA B.B.C., PEREIRA I.R.O. Obtaining kefir powder by spray dryer. 10th NIZO Dairy Conference - Innovations in Dairy Ingredients, 2017 Papendal, The Netherlands [Abstract P.22].

SCHUCK, P. et al. **Spray drying of dairy bacteria: New opportunities to improve the viability of bacteria powders**. International Dairy Journal, Oxford, v.31, n.1, p.12-17, 2013.

Contatos: laricarvalhoc@hotmail.com

isabela.pereira@mackenzie.br