

# ENCAPSULAÇÃO E SECAGEM DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

Henrique Ortuño Moreno <sup>1</sup>; Cynthia Jurkiewicz Kunigk <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Aluno de Iniciação Científica da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT);

<sup>2</sup> Professora da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT).

**Resumo.** *O presente trabalho teve o objetivo de avaliar o processo de encapsulação de microrganismos probióticos em alginato de cálcio pela técnica de aspersão através da variação da vazão de ar e de vazão de solução de alginato de sódio, bem como a sobrevivência dos microrganismos após a encapsulação e posterior liofilização. Os resultados mostraram que o aumento da vazão de ar reduz o rendimento do processo e reduz o diâmetro das cápsulas. O congelamento e a liofilização reduziram a população das bactérias probióticas encapsuladas. A sobrevivência dos microrganismos probióticos foi maior nas cápsulas com maior diâmetro médio.*

## Introdução

O mercado dos produtos dito saudáveis vem aumentando a cada ano, novos ingredientes e novos produtos estão sendo desenvolvidos pela indústria com apelo de reduzir problemas de saúde e proporcionar uma vida mais saudável (Moirá, 2003).

Por outro lado, os atuais consumidores procuram uma alimentação adequada, visando alimentos que associem saúde ao bem-estar. Com o conhecimento dos benefícios causados por microrganismos probióticos, aumentou o interesse dos consumidores por produtos com essas características.

O termo probiótico se refere a microrganismos vivos, que administrados em quantidades adequadas, garantem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/ WHO, 2001). Já os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, por estimularem seletivamente a proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon (Mongensen et al, 2000).

Produtos lácteos fermentados e não fermentados são considerados adequados para a sobrevivência de microrganismos probióticos. Segundo vários estudos os microrganismos devem permanecer viáveis e em número elevado (acima de  $10^6$  UFC/g) durante o processamento e armazenamento do alimento para que os efeitos benéficos sejam obtidos (Anal e Sing, 2007).

A legislação brasileira tem como requisito específico a quantidade mínima viável para os probióticos na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  UFC na recomendação diária do produto, sendo que, para quantidades menores a aceitação depende da comprovação da eficiência do fabricante (ANVISA, 2008)

A encapsulação de microrganismos probióticos tem sido utilizada para aumentar a sobrevivência das bactérias no alimento e durante a passagem pelo trato digestivo. Entretanto é importante que as características sensoriais do produto não sejam prejudicadas. Segundo Boscarioli (2010) a adição de microrganismos probióticos encapsulados em sorvete não foi perceptível ao paladar, indicando que a encapsulação é uma tecnologia viável para o desenvolvimento de alimentos probióticos.

A encapsulação de probióticos com alginato de cálcio pode ser uma alternativa para o desenvolvimento de alimentos probióticos com baixa atividade de água, como cereais, chocolate, queijos duros, manteiga e margarinas. Entretanto é necessário que as cápsulas sejam secas de forma a apresentarem uma umidade compatível com o alimento no qual será adicionada (Anal e Singh, 2007).

A preservação de microrganismos por diferentes métodos de secagem tem sido utilizada há décadas. A liofilização em particular é o método preferido para conservação de

microrganismos, entretanto o uso de “spray drier” e secadores de leite fluidizado também são empregados pela indústria (Morgan et al., 2006).

Considerando a pequena diversidade de alimentos probióticos, o estudo da encapsulação e secagem são fundamentais para o desenvolvimento de novos alimentos probióticos com baixa atividade de água.

De forma a colaborar com o estudo sobre a encapsulação de microrganismos probióticos, este trabalho teve como objetivo avaliar o processo de encapsulação de microrganismos probióticos em alginato de cálcio pela técnica de aspersão através da variação da vazão de ar e de vazão de solução de alginato de sódio, bem como a sobrevivência dos microrganismos após a encapsulação e posterior liofilização.

## **Material e Métodos**

### Microrganismos probióticos

As culturas liofilizadas utilizadas foram: *Lactobacillus acidophilus* NCFM FloraFIT com contagem celular de aproximadamente  $1,5 \times 10^{11}$  UFC/g de produto e *Bifidobacterium lactis* BI-04 FloraFIT com contagem celular de  $4,5 \times 10^{11}$  UFC/g, ambos da empresa Danisco Brasil Ltda. As culturas foram mantidas à  $-18^{\circ}\text{C}$  até o momento da utilização.

### Produção das cápsulas de alginato de cálcio

A produção das cápsulas de alginato de cálcio foi feita pela técnica de aspersão desenvolvida por Liserre, Ré e Franco (2007) e modificada por Boscarioli (2010). Uma solução de alginato de sódio 1,0 % (Vetec) contendo 2,0% de goma acácia (Colloides Naturels Brasil) foi aspergida em solução de cloreto de cálcio 0,1 M (Vetec). Para a aspersão da solução foi utilizado um tubo de aço inoxidável (1,0 m de comprimento, diâmetro interno de 12 mm e externo de 16,5 mm) com o bocal acoplado a um bico de equipamento “spray drying” com saída tipo leque ( $45^{\circ}$ , modelo 1/4J da Systens do Brasil). As cápsulas formadas foram deixadas em repouso na solução de cloreto de cálcio durante 30 minutos e então retiradas da solução por peneiras de aço inoxidável (mesh de 250, 355, 500, 710 e  $1000\ \mu\text{m}$ ) e lavadas com água destilada. Foram utilizadas três vazões de ar ( $1,5 \pm 0,5$ ;  $3,0 \pm 0,5$  e  $4,5 \pm 0,5\ \text{m}^3/\text{min}$ ) e três vazões da solução de alginato de sódio ( $2,1 \pm 0,4$ ;  $3,93 \pm 0,04$  e  $5,93 \pm 0,09\ \text{mL}/\text{min}$ ).

As cápsulas com microrganismos probióticos foram produzidas apenas com a vazão da solução de alginato de sódio de  $5,93 \pm 0,09\ \text{mL}/\text{min}$  e vazão de ar de  $1,5 \pm 0,5$  e  $3,0 \pm 0,5\ \text{m}^3/\text{min}$ . Os microrganismos foram adicionados à solução de alginato de sódio na concentração de 0,5% de *Lactobacillus acidophilus* e 1,0 % de *Bifidobacterium lactis*. As cápsulas contendo os microrganismos foram separadas apenas pela peneira de aço inoxidável com mesh de  $250\ \mu\text{m}$ , de forma a reter todas as cápsulas de maior diâmetro.

### Liofilização das cápsulas

Parte das cápsulas que foram produzidas foi refrigerada a  $4^{\circ}\text{C}$  e parte foi congelada ( $-18^{\circ}\text{C}$  por 24 h) no mesmo dia da produção. Parte das cápsulas que foram congeladas durante 24 h foram analisadas e parte foi liofilizada. A liofilização foi realizada em Liofilizador Enterprise I (Terroni Equipamentos Científicos), onde as cápsulas eram colocadas congeladas ( $-18^{\circ}\text{C}$ ). As cápsulas foram retiradas do liofilizador 24 h após o início do processo (vácuo: 0,200 –  $0,300\ \mu\text{Hg}$  e temperatura do condensador de  $-37^{\circ}\text{C}$ )

### Determinação do diâmetro médio das cápsulas

O diâmetro das cápsulas produzidas com as três vazões de ar e as três vazões da solução de alginato de sódio, sem a utilização dos microrganismos probióticos, foi determinado em duplicata. As cápsulas foram separadas em peneiras de aço inoxidável (mesh de 250, 355, 500, 710 e 1000  $\mu\text{m}$ ) e lavadas com água destilada. As cápsulas foram coradas com fucsina e observadas em microscópio biocular (CBA Olympus) com lente ocular micrométrica previamente calibrada. Foi determinado o diâmetro de 20 cápsulas retidas em cada peneira. A massa de cápsulas retidas em cada peneira foi utilizada para cálculo de uma média ponderada do diâmetro.

### Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas para contagem de *Lactobacillus acidophilus* foram realizadas em duplicata, em meio de cultura MRS ágar. As placas foram incubadas em estufa a 43°C por 72 horas em jarras de anaerobiose, contendo gerador de anaerobiose Anaerogem (OXOID). As colônias típicas de *Lactobacillus acidophilus* apresentaram diâmetro de aproximadamente 3 mm, coloração branca, leitosa, achatadas e com borda irregular. Para contagem de *Bifidobacterium lactis*, as análises também foram realizadas em duplicata, em meio de cultura MRS ágar contendo soluções A, B e C. A solução A consiste em 0,01% de antibiótico Dicloxacilina de sódio monohidratada, a solução B consiste em cloreto de lítio a 10%, e a solução C consiste em Cloridrato de L-cisteína a 10%. Foram adicionados 0,5% da solução A, 1,0% da solução B e 0,5% da solução C no meio de cultura. As três soluções foram adicionadas ao meio de cultura após filtração em membrana com diâmetro de 0,20  $\mu\text{m}$ . As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas em jarras de anaerobiose, contendo gerador de anaerobiose Anaerogem (OXOID). As colônias de *Bifidobacterium lactis* apresentam diâmetro entre 2 e 3 mm, coloração branca, leitosa e forma de lentilha (Oliveira, 2008).

### Análise Estatística

Os resultados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) utilizando o Microsoft Office Excel. A comparação das médias foi realizada através do teste de Duncan, considerando-se um nível de significância de 5%.

## **Resultados e Discussão**

### Rendimento do processo de encapsulação e diâmetro das cápsulas

A determinação do rendimento ( $\text{g}_{\text{cápsulas}}/\text{mL}_{\text{solução}}$ ) foi realizada para as três vazões de ar e três vazões de solução de alginato de sódio. Observa-se na Figura 1 uma redução no rendimento com a redução da vazão de ar. Para cada vazão da solução de alginato foi possível ajuste de uma equação linear que correlaciona o rendimento com a vazão de ar. As correlações lineares e o coeficiente de correlação para as vazões de  $5,93 \pm 0,09 \text{ mL/min}$ ;  $3,93 \pm 0,04 \text{ mL/min}$  e  $2,1 \pm 0,4 \text{ mL/min}$  estão apresentados nas equações 1, 2 e 3, respectivamente, sendo x a vazão de ar ( $\text{mL/min}$ ) e y o diâmetro das cápsulas ( $\mu\text{m}$ ).

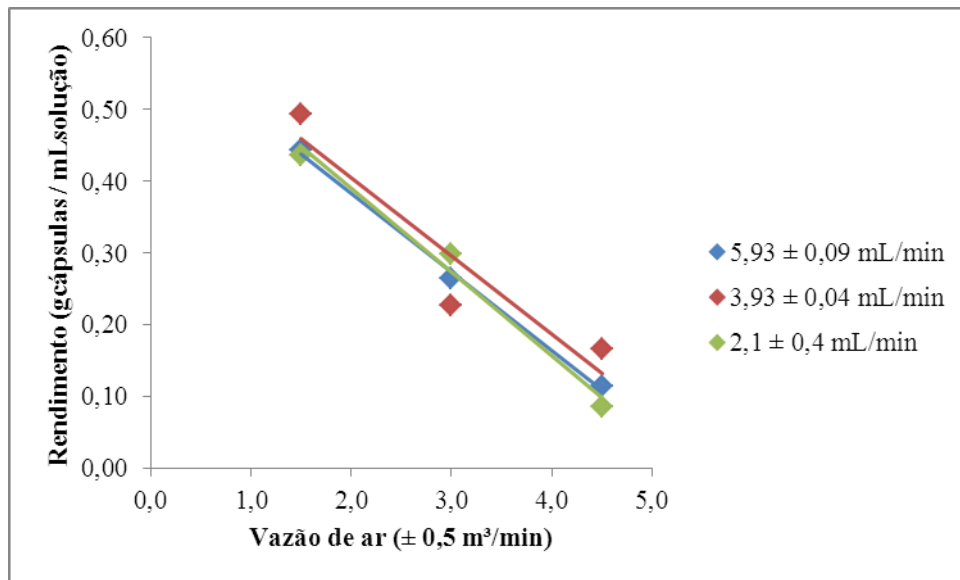


Figura 1 – Rendimento ( $\text{g}_{\text{cápsulas}}/\text{mL}_{\text{solução}}$ ) em determinadas vazões de ar e vazão da solução de alginato de cálcio

$$y = -0,110x + 0,603 \quad (r = 0,99) \quad \text{equação 1}$$

$$y = -0,109x + 0,622 \quad (r = 0,93) \quad \text{equação 2}$$

$$y = -0,117x + 0,624 \quad (r = 0,99) \quad \text{equação 3}$$

O maior rendimento foi obtido com a menor vazão de ar ( $1,5 \pm 0,5 \text{ m}^3/\text{min}$ ), onde foram obtidas cápsulas de maior diâmetro médio, correspondente a  $(14 \pm 4) \cdot 10^2 \mu\text{m}$ .

Por outro lado, a vazão da solução de alginato de sódio não influenciou significativamente ( $p > 0,05$ ) o rendimento do processo.

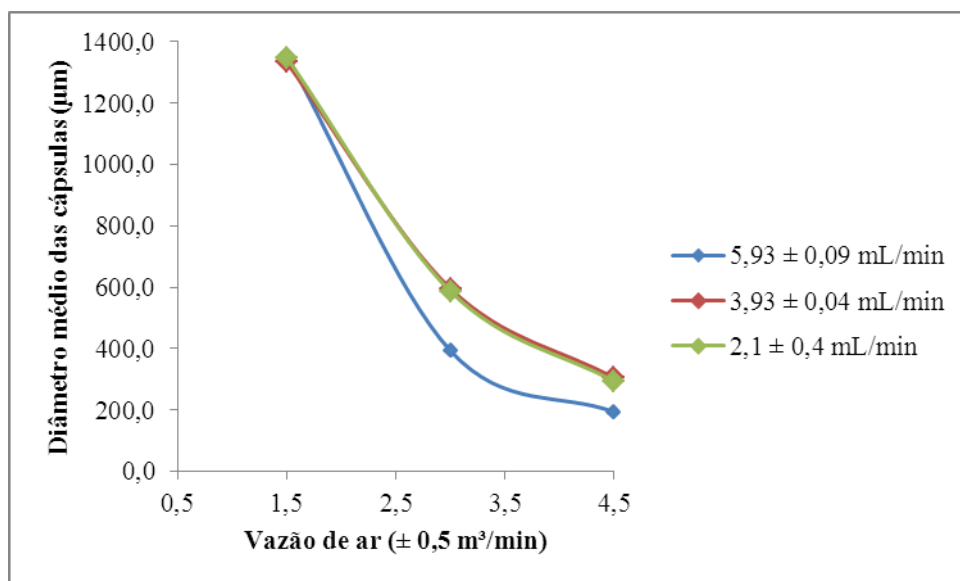


Figura 2 – Diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) em determinadas vazões de ar e vazão da solução de alginato de sódio

O diâmetro das cápsulas também não foi influenciado pela vazão da solução de alginato de sódio ( $p>0,05$ ), mas foi influenciado pela vazão de ar ( $p<0,05$ ) sendo que, quanto maior a vazão de ar, menor o diâmetro médio das cápsulas (Figura 2).

Nota-se também na figura 2 que o aumento da vazão de ar de  $1,5 \pm 0,5$  para  $3,0 \pm 0,5$  m<sup>3</sup>/min, reduziu muito o diâmetro médio das cápsulas, uma variação entre 800 e 1000 µm. Já com o aumento da vazão de ar de  $3,0 \pm 0,5$  para  $4,5 \pm 0,5$  m<sup>3</sup>/min a redução no diâmetro das cápsulas foi bem menor, correspondendo a uma variação entre 200 e 300 µm. Portanto a relação obtida entre a vazão de ar e o diâmetro das cápsulas não é linear, diferentemente do observado para o rendimento do processo.

#### Sobrevivência dos microrganismos probióticos encapsulados

As Tabelas 1 e 2 apresentam os valores das populações de microrganismos probióticos encapsulados (log UFC/g), com diferentes diâmetros de cápsula, submetidos ao processo de refrigeração, congelamento e secagem.

Tabela 1 – População de *Bifidobacterium lactis* (log UFC/g) nas cápsulas de alginato de cálcio

	log UFC/g	
	Diâmetro (µm)	Diâmetro (µm)
Cápsulas	$(4 \pm 1) \cdot 10^2$ µm	$(14 \pm 4) \cdot 10^2$ µm
<b>Refrigeradas</b>	$9,3 \pm 0,4$	$9,6 \pm 0,2$
<b>Congeladas</b>	$8,7 \pm 0,1$	$8,7 \pm 0,1$
<b>Liofilizadas</b>	$8,6 \pm 1,4$	$7,3 \pm 0,5$

Tabela 2 – População de *Lactobacillus acidophilus* (log UFC/g) nas cápsulas de alginato de cálcio

	log UFC/g	
	Diâmetro (µm)	Diâmetro (µm)
Cápsulas	$(4 \pm 1) \cdot 10^2$ µm	$(14 \pm 4) \cdot 10^2$ µm
<b>Refrigeradas</b>	$9,1 \pm 0,4$	$9,1 \pm 0,4$
<b>Congeladas</b>	$8,8 \pm 0,2$	$8,6 \pm 0,1$
<b>Liofilizadas</b>	$8 \pm 1$	$8,3 \pm 0,2$

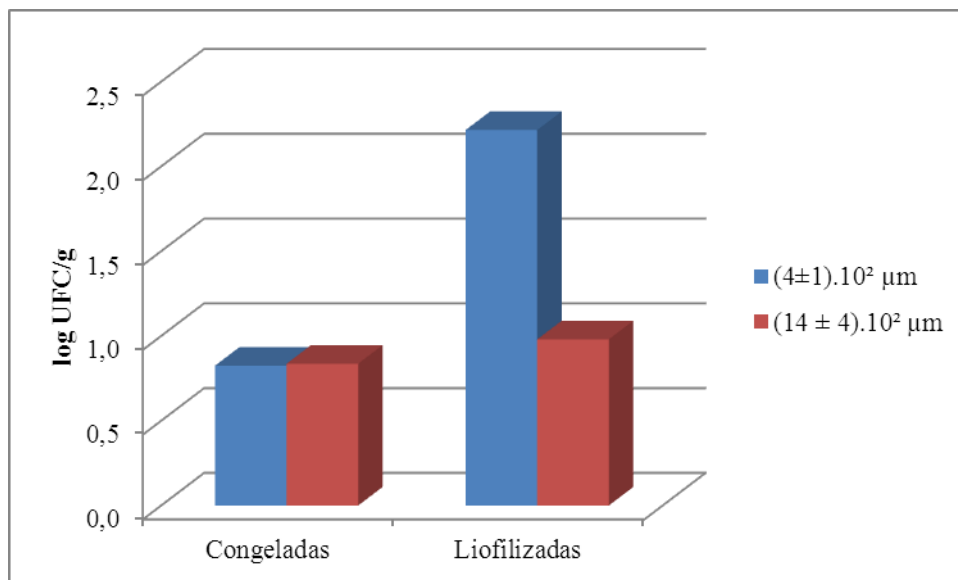


Figura 3 – Redução da população de *Bifidobacterium lactis* (log UFC/g) nas cápsulas de alginato de cálcio

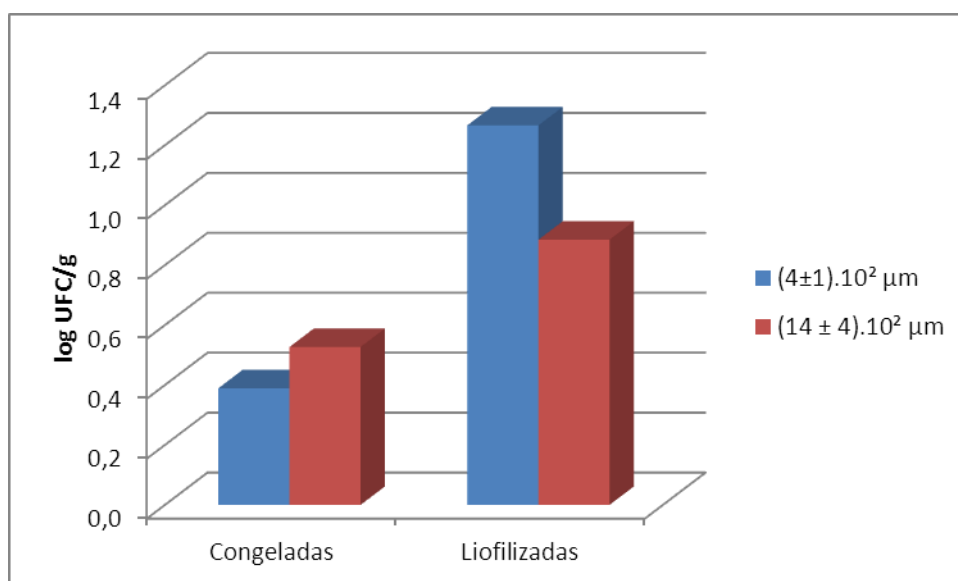


Figura 4 – Redução da população de *Lactobacillus acidophilus* (log UFC/g) nas cápsulas de alginato de cálcio

As Figuras 3 e 4 apresentam a redução da população dos microrganismos probióticos nas cápsulas de alginato de cálcio em relação às cápsulas refrigeradas, para cada diâmetro médio de cápsula. Nota-se que há redução de ambos os microrganismos probióticos nas cápsulas congeladas e liofilizadas.

A contagem de *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus acidophilus* apresentou maior redução da população nas cápsulas de menor diâmetro quando comparadas às cápsulas refrigeradas, sugerindo que as cápsulas de maior diâmetro oferecem maior resistência aos microrganismos.

As cápsulas refrigeradas (dia seguinte após a produção) apresentaram uma contagem de microrganismos maior que nas cápsulas congeladas e nas cápsulas liofilizadas, portanto, o congelamento e a liofilização desses microrganismos são capazes de diminuir sua população.

## Conclusões

No processo de encapsulação em alginato de cálcio pela técnica de aspersão, as altas vazões de ar ocasionam a formação de cápsulas com menor diâmetro médio e menor rendimento na produção das mesmas.

O congelamento e a liofilização de bactérias probióticas encapsuladas em alginato de cálcio diminuem a população das mesmas.

A encapsulação de microrganismos probióticos e secagem em liofilizador em conjunto são alternativas viáveis para indústrias de alimentos produzirem alimentos secos com característica probiótica.

## Referências Bibliográficas

- Anal, A. K.; Singh, H. (2007) Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, v. 18, p. 240-251.
- ANVISA. (2008) Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos – Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm). Acesso em 16.11.2011.
- Boscarioli, M. P. M. (2010) *Influência de prebióticos na encapsulação de bactérias probióticas adicionadas em sorvete*. Dissertação de Mestrado da Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia.
- FAO/ WHO. (2011) Evaluation of health and nutritional properties of powder milk with live lactic acid bacteria. FAO/ WHO Expert Consultation, 34 p., Córdoba. Disponível em [www.fao.org/es/esn/food/prebioreport\\_en.pdf](http://www.fao.org/es/esn/food/prebioreport_en.pdf). Acesso em 28.01.2011.
- Liserre, A. M.; RÉ, M. I.; Franco, B. D. G. M. (2007) Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Biotechnology*, v. 21, n. 1, p. 1-16.
- Moira, H. (2003) Future for dairy products in the functional foods market. *Australian Journal Dairy Technology*, vol. 58, p. 98-103.
- Mongensen, G.; Rowland, I.; Micvedtt, T.; Fonden, R. (2000) Functional aspects of pro- and prebiotics: A literature review on immune modulation and influence on cancer. *Microbial Ecology in Health and Disease*, v. 12, n. 2, p. 40-44.
- Morgan, C. A.; Herman, N.; White, P. A.; Vese, G. (2006) Preservation of micro-organisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods*, v. 66, p. 183-193.
- Oliveira, L. B. (2008) Efeito de goma acácia e inulina na viabilidade de bactérias probióticas e nas características físico-químicas de leite fermentado simbiótico. Dissertação de Mestrado da Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia.