

MICROENCAPSULAÇÃO DE LACTOBACILLUS PROBIÓTICO E APLICAÇÃO EM SMOOTHIE

Júlia Machado Silberschmidt ¹; Cristiane Pereira de Oliveira ²; Cynthia Jurkiewicz Kunigk ³

¹ Aluna de Iniciação Científica da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT);

² Aluna de Mestrado da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT);

³ Professora da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT).

Resumo. *Os consumidores atualmente buscam alimentos que além de serem saborosos, também apresentem características funcionais. O desenvolvimento de um smoothie probiótico vem ao encontro desta proposta, aliando os benefícios e o sabor das frutas, à funcionalidade de microrganismos probióticos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a sobrevivência de Lactobacillus rhamnosus microencapsulado, adicionado em smoothie de frutas durante 21 dias de armazenamento e durante a simulação gastrintestinal in vitro. A bactéria foi encapsulada em alginato de cálcio, utilizando a técnica da extrusão, com dois diferentes diâmetros de cápsulas e, em seguida, foi adicionada ao smoothie. Durante os 21 dias de armazenamento a 5°C foi realizada a contagem do probiótico e avaliada a resistência gastrintestinal no primeiro e 21º dia. Durante o armazenamento do smoothie, a contagem de L. rhamnosus permaneceu elevada (acima de 10⁷ UFC/g) independentemente das células estarem encapsuladas ou livres. O aumento do diâmetro das cápsulas reduziu a viabilidade do microrganismo no final da simulação gastrintestinal in vitro.*

Introdução

O termo “probiótico” se refere aos microrganismos que ao serem ingeridos vivos e em quantidade adequada apresentam benefícios à saúde do hospedeiro (SATHYABANA, et al. 2014). A ocorrência destes benefícios depende do alimento em que o probiótico está inserido e da cepa utilizada (STANTON, et al. 2001), porém uma dose diária de 10⁶ células viáveis por grama de produto foi proposta por LEE e SALMINEN (1995). Nos alimentos os probióticos devem permanecer viáveis e em número elevado, durante toda vida útil do produto. Entretanto, como alguns alimentos apresentam características e condições de armazenamento não favoráveis à sobrevivência da bactéria, faz-se necessário a utilização de técnicas que ajudem na proteção do microrganismo, como por exemplo, a microencapsulação.

A microencapsulação pode ser realizada por meio de spray-drying, leite fluidizado, extrusão, técnica de separação de fases/coacervação, emulsão, imobilização em gordura e em grânulos de amido (MENEZES, et al. 2013). Também é possível, para a mesma técnica de encapsulação, variar as condições de processo (composição da solução encapsulante, temperatura, vazão, etc) de forma a obter cápsulas com características mais adequadas à sobrevivência da bactéria no alimento. A técnica da extrusão consiste no preparo de uma solução hidrocolóide, como alginato de sódio, na qual são adicionados os microrganismos. A extrusão desta suspensão é realizada por meio de uma seringa, gotejando-a em uma solução de endurecimento do hidrocolóide (CaCl₂), onde as cápsulas são formadas instantaneamente. O tamanho e o formato das microcápsulas variam de acordo com o diâmetro da seringa utilizada, com a viscosidade da solução de alginato, e com a distância entre o dispositivo e a solução de cloreto de cálcio.

Os *smoothies*, por apresentarem alta concentração de mais de uma fruta, podem ser classificados como sucos tropicais, apresentando características diferenciais de cremosidade, leveza e frescor (TEIXEIRA 2012). Entretanto, devido ao seu baixo pH não são considerados veículos adequados para microrganismos probióticos, uma vez que valores de pH menores que 4,5 dificultam a sobrevivência das bactérias durante a vida de prateleira do produto refrigerado.

Sendo assim, a microencapsulação da cultura pode ser uma alternativa para aumentar sua viabilidade em bebidas de alta acidez, como os *smoothies*.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do diâmetro das microcápsulas de alginato de cálcio contendo *Lactobacillus rhamnosus*, na sobrevivência do microrganismo, adicionado em *smoothie* de frutas amarelas comercial, durante 21 dias de armazenamento e durante a simulação gastrointestinal *in vitro*.

Material e Métodos

Preparo da cultura probiótica

A cultura liofilizada de *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DuPont) foi cultivada em frascos contendo 99 ml de caldo MRS, durante 21 h em estufa à 37,0 °C. O caldo foi centrifugado (Mega 21R, Hanil) por 15 minutos em temperatura de 4°C e rotação de 6000 rpm, para obtenção do pellet, que foi lavado duas vezes com solução salina estéril 0,85%, suspenso em 20 ml de salina e adicionado em 180 mL da solução encapsulante de alginato de sódio.

Microencapsulação

A técnica de encapsulação utilizada foi a de extrusão conforme descrita por BOSCAROLI (2010) com modificações. A solução encapsulante de alginato de sódio 1,0% contendo a bactéria probiótica foi aspergida, através de um bico aspersor tipo leque, em uma solução de cloreto de cálcio 0,1 M onde as cápsulas eram formadas. As cápsulas permaneceram 30 min na solução antes de serem separadas por filtração. A separação das cápsulas da solução de cloreto de cálcio foi feita por meio de duas peneiras de aço inox de diferentes aberturas de malha, 710 e 250 µm, e por papéis de filtro qualitativo. A lavagem foi feita com solução salina 0,85% estéril. As cápsulas retidas na peneira com abertura de 250 µm e nos papéis de filtro foram adicionadas ao *smoothie*.

A variação das condições de processo geram cápsulas com características diferentes. Para este estudo foram produzidos dois diferentes tipos de cápsulas, as quais estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 – Descrição das condições de processo para produção de cápsulas com diferentes diâmetros.

Cápsula	Composição da Solução Encapsulante	Vazão Solução Encapsulante (mL.min ⁻¹)	Vazão Ar Comprimido (L.min ⁻¹)	Diâmetro (µm)
1	Alginato de sódio 1,0 %	12,1 ± 0,5	6,3 ± 0,2	34 ± 8
2	Alginato de sódio 1,0 %	12,1 ± 0,5	3,72 ± 0,09	231 ± 17

Adição do microrganismo ao *smoothie*

Em tubos de polipropileno estéreis de 15 mL foram adicionados 1,0 g das cápsulas e 10,0 g de *smoothie*. As amostras foram homogeneizadas em agitador vortex, e armazenadas a 4°C por 21 dias.

Para a adição das células livres, foram adicionados 20 mL de *smoothie* ao *pellet* formado e homogeneizado em agitador mecânico. Esta suspensão foi transferida para um saco plástico estéril e 240 mL de *smoothie* foram adicionados. A mistura foi homogeneizada em *stomacher* (Seward) a 260 rpm por 1 minuto, e frações de 10,00 g foram transferidas para tubos de 15 mL estéreis, que foram armazenados a 4°C por 21 dias

Simulação gastrintestinal

A simulação gastrointestinal foi realizada segundo metodologia descrita por MADUREIRA, et al. (2011) e VERRUCK, et al. (2015) com algumas modificações. A simulação apresenta três etapas: fase gástrica (FG), fase duodeno (FD) e fase íleo (FI). As amostras para determinar a contagem de probióticos foram retiradas após 30 min (FG30) e 90 min (FG90) da fase gástrica, após 30 min da fase duodeno (FD) e após 60 min da fase íleo (FI).

Na fase gástrica, foi adicionado HCl 1M para redução do pH entre 2,1 e 2,5 e solução de pepsina (P7012, Sigma-Aldrich) na concentração de 25 g/L preparada em HCl 0,1 M, de modo que a concentração no meio de reação fosse 1,25 g/L. Nesta fase, a amostra foi submetida a uma agitação de 130 rpm, por 90 minutos.

Para a etapa do duodeno foi adicionado NaHCO₃ 1 M para aumento do pH entre 4,5 a 5,2, e, em seguida utilizou-se uma solução contendo 2 g/L de pancreatina (P1750, Sigma-Aldrich) e 12 g/L de sais biliares bovino e ovino (B8381, Sigma-Aldrich) em NaHCO₃ 0,1 M. A concentração final no meio de reação foi de 0,55 g/L de pancreatina e 3,3 g/L de sais biliares. Os tubos permaneceram sob agitação de 45 rpm durante 30 min.

Na fase íleo foi adicionado NaHCO₃ 1M para aumento do pH entre 6,3 a 6,5 e solução 2 g/L de pancreatina e 12 g/L de sais biliares em NaHCO₃ 0,1M para correção da concentração no meio de reação para 0,55 g/L e 3,3 g/L respectivamente. O tubo permaneceu sob agitação de 45 rpm durante 60 minutos.

Enumeração de *L. rhamnosus*

Para a quantificação de *L. rhamnosus* no *smoothie* durante o armazenamento e durante a simulação gastrintestinal as amostras encapsuladas foram diluídas em solução tampão fosfato, pH 7,0, e homogeneizada em Stomacher à 230 rpm por 10 min. Já as amostras contendo células livres foram diluídas em solução salina 0,85% estéril e homogeneizadas em Stomacher à 260 rpm por 1 min.

Após as diluições as amostras foram cultivadas em agar MRS (Oxoid) e as placas foram incubadas em estufa à 37,0 °C por 48 horas.

Planejamento experimental e análise estatística

Foram avaliados 3 tratamentos: células livres no *smoothie* (T1), bactérias encapsuladas em alginato 1,0% com vazão de ar comprimido de 3,7 L/min (T2) e bactérias encapsuladas em alginato 1,0% com vazão de ar comprimido de 6,3 L/min (T3).

Em cada um dos tratamentos, para acompanhamento da sobrevivência da bactéria no *smoothie*, foram realizadas análises microbiológicas nos dias 1, 7, 14 e 21. Já a simulação gastrintestinal foi realizada apenas nos dias 1 e 21 de armazenamento.

Para análise estatística dos dados, foi realizada análise de variância e método de Tukey, com nível de significância de 5,0%.

Resultados e Discussão

A tabela 2 apresenta os valores médios para as contagens de *L. rhamnosus* no *smoothie* durante os 21 dias de armazenamento a 5°C.

As contagens de *L. rhamnosus* livre e encapsulado em cápsulas de maior diâmetro (231±17 µm) não apresentaram diferença significativa ao longo do armazenamento. Entretanto quando a encapsulação foi realizada em cápsulas de menor diâmetro (34±8 µm), as contagens tiveram uma redução significativa (p < 0,05) no 21º, 0,7 log em relação ao primeiro dia de armazenamento. As cápsulas de menor diâmetro reduziram a viabilidade da bactéria no *smoothie* no 21º dia de armazenamentos quando comparada com as células livres.

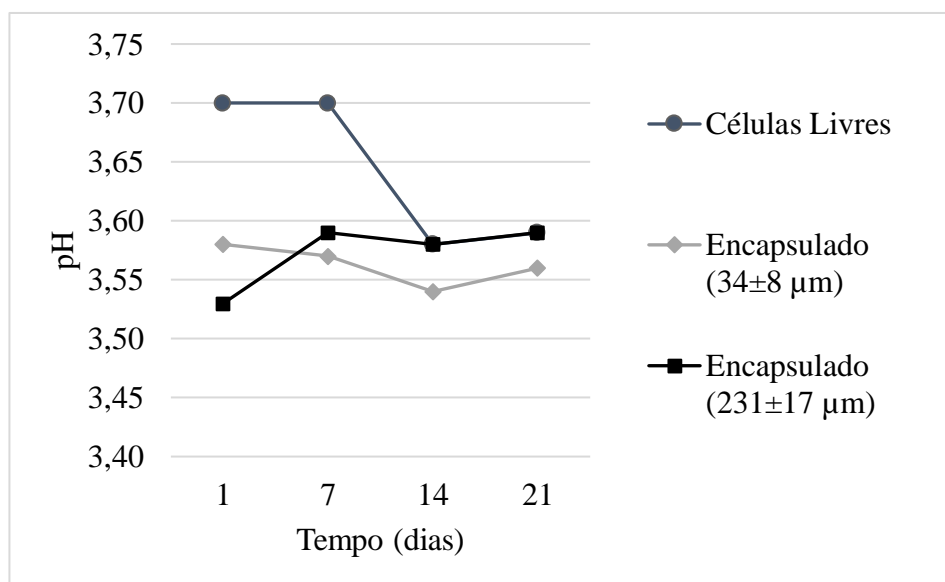
Tabela 2 – Contagem de *L. rhamnosus* durante 21 dias de armazenamento

Tempo (dias)	Log UFC/g		
	Livre	Encapsulado (34±8 µm)	Encapsulado (231±17 µm)
1	8,27±0,08 ^{Aa}	8,2±0,2 ^{Aa}	7,94±0,01 ^{Aa}
7	8,2±0,1 ^{Aa}	7,99±0,09 ^{Aa}	7,8±0,2 ^{Aa}
14	8,2±0,2 ^{Aa}	7,83±0,04 ^{ABa}	7,7±0,3 ^{Aa}
21	8,2±0,1 ^{Aa}	7,5±0,3 ^{Bb}	7,7±0,1 ^{Aab}

A,B – médias com letras maiúsculas sobrescritas em comum na mesma coluna não diferem significativamente ($p > 0,05$).

a,b – médias com letras minúsculas sobrescritas em comum na mesma linha não diferem significativamente ($p > 0,05$).

Para todos os tratamentos avaliados a contagem de *L. rhamnosus* ao final de 21 dias de armazenamento permaneceu acima de 10^7 UFC/mL, indicando boa resistência da bactéria ao baixo pH do *smoothie*. No início do armazenamento o pH dos *smoothies* dos três tratamentos variou de 3,53 a 3,70 e com 21 dias a variação foi de 3,56 a 3,59 (Figura 1).

Figura 1 - Valores de pH do *smoothie* durante 21 dias de armazenamento

Na simulação gastrointestinal in vitro realizada no 1º dia de armazenamento (Tabela 3), a análise estatística demonstrou haver interação significativa entre o tratamento e a fase da simulação. Para as células livres e encapsuladas (34±8 µm), as contagens foram semelhantes ao longo da simulação e entre os tratamentos, sem diferença significativa ($p > 0,05$). Na fase gástrica as contagens se mantiveram constantes, sem apresentar redução significativa ($p > 0,05$), entretanto na fase duodeno e íleo a redução foi de 5 log nos dois tratamentos. Na encapsulação com cápsulas de maior diâmetro (231±17 µm), a redução na contagem do probiótico na fase gástrica (FG90) foi de 1 log, entretanto não significativa ($p > 0,05$). Já na fase íleo (FI) a redução da contagem da bactéria foi de 4,8 log.

Tabela 3 – Contagem de *L. rhamnosus* durante simulação gastrointestinal no dia 1 de armazenamento

Fase	Log UFC/g		
	Livre	Encapsulado (34±8 µm)	Encapsulado (231±17 µm)
Início	8,27±0,08 ^{Aa}	8,1±0,1 ^{Aa}	7,94±0,01 ^{Aa}
FG30	8,1±0,2 ^{Aa}	7,9±0,1 ^{Aa}	6,95±0,02 ^{ABa}
FG90	8,1±0,2 ^{Aa}	8,1±0,2 ^{Aa}	6,8±0,2 ^{ABa}
FD	3,23±0,01 ^{Bb}	3±1 ^{Bb}	5,69±0,07 ^{Ba}
FI	3,7±0,3 ^{Ba}	3,6±0,8 ^{Ba}	2±0 ^{Cb}

A, B, C – médias com letras maiúsculas sobrescritas em comum na mesma coluna não diferem significativamente.

a, b, c – médias com letras minúsculas sobrescritas em comum na mesma linha não diferem significativamente.

Analisando cada uma das fases (Figura 2), é possível observar que os tratamentos não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$) até o final da fase gástrica. Na fase duodeno, as cápsulas (231±17 µm) maiores se mostraram mais eficazes na proteção do microrganismo, porém, na fase íleo (FI), ocorreu uma queda de 75% na contagem do probiótico, atingindo valor significativamente menor ($p < 0,05$) do que dos outros tratamentos. Já para as células livres e encapsuladas com menor diâmetro (34±8 µm), as contagens não diferiram significativamente ($p > 0,05$) durante todo o teste de simulação gastrointestinal *in vitro*.

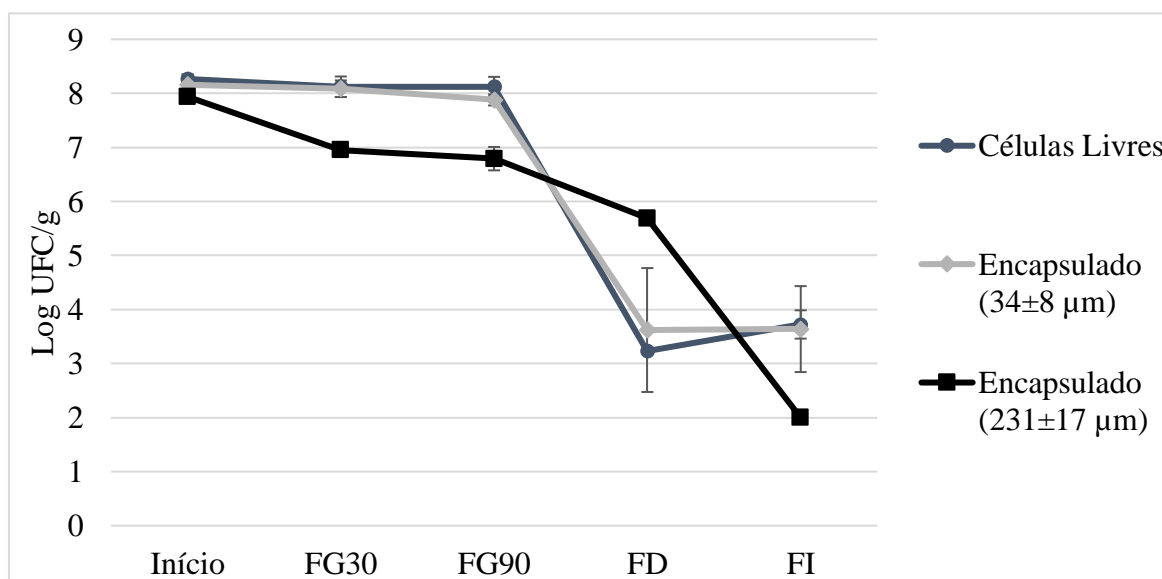


Figura 2 - Contagem de *L. rhamnosus* durante simulação gastrointestinal no dia 1 do armazenamento

Para a simulação no 21º dia, a análise estatística também mostrou haver interação significativa entre a fase da simulação e o tratamento. Os resultados estão na tabela 4.

Tabela 4 - Contagem de *L. rhamnosus* durante simulação gastrointestinal no dia 21 de armazenamento

Fase	Log UFC/g		
	Livre	Encapsulado (34±8 µm)	Encapsulado (231±17 µm)
Início	8,2±0,1 ^{Aa}	7,7±0,1 ^{Aa}	7,7±0,1 ^{Aa}
FG30	8,11±0,01 ^{Aa}	7,5±0,3 ^{Aa}	7,6±0,1 ^{Aa}
FG90	7,7±0,2 ^{Aa}	7,2±0,3 ^{Aa}	7,1±0,7 ^{Aa}
FD	2±1 ^{Bb}	4,4±0,3 ^{Bab}	5,2±0,5 ^{Ba}
FI	3±2 ^{Ba}	3,1±0,9 ^{Ba}	1,79±0,02 ^{Ca}

A, B, C – médias com letras maiúsculas sobrescritas em comum na mesma coluna não diferem significativamente.

a, b, c – médias com letras minúsculas sobrescritas em comum na mesma linha não diferem significativamente.

No dia 21, as células livres e encapsuladas tiveram comportamento semelhante ao observado na simulação do dia 1. Na fase gástrica tanto as células livres como encapsuladas não apresentaram variação significativa ($p > 0,05$), mantendo a contagem inicial. Na fase duodeno (FD) a maior redução do número de probióticos foi observada para as células livres (6,2 log), diferindo significativamente ($p > 0,05$) da redução para células encapsuladas com maior diâmetro (2,5 log). Por outro lado, na fase íleo (FI) as contagens no tratamento com cápsulas maiores apresentou a maior redução (3,4 log), enquanto no tratamento com células livres e com cápsulas de menor diâmetro, a variação não foi significativa ($p > 0,05$) (Figura 3).

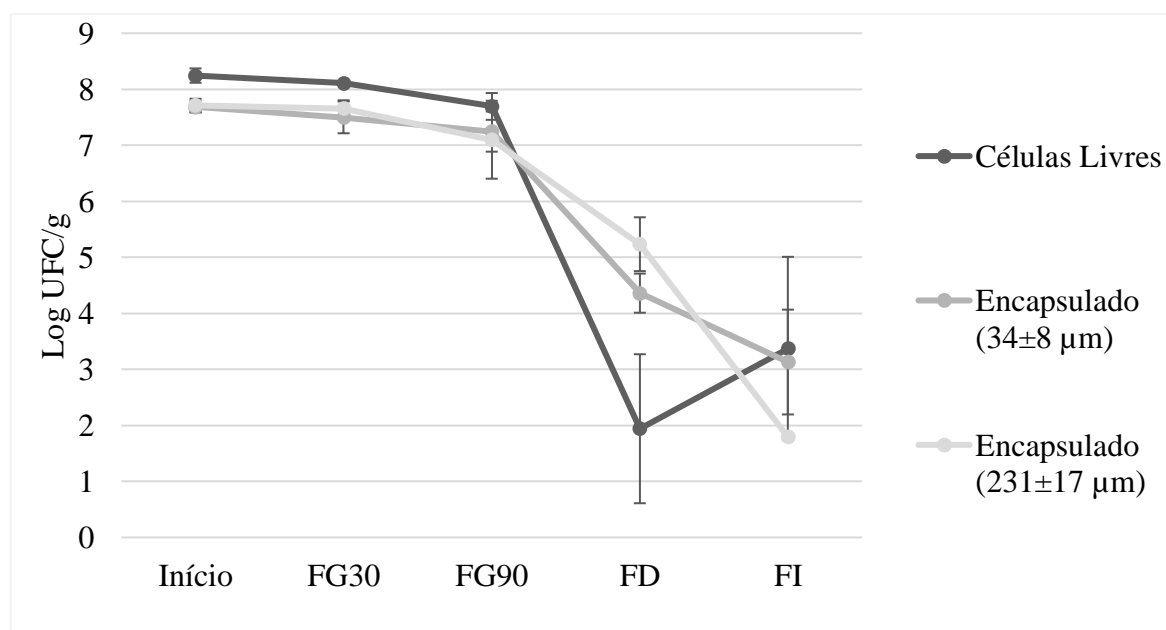


Figura 3 - Contagem de *L. rhamnosus* durante simulação gastrointestinal no dia 21 do armazenamento

No final da fase íleo o tratamento com cápsulas de maior diâmetro apresentou contagens significativamente menores (1,7 log) que o tratamento com células livres, no primeiro dia de armazenamento, entretanto no vigésimo primeiro dia a diferença não foi significativa ($p > 0,05$), embora a contagem tenha sido 1 log menor. Já o tratamento com cápsulas de diâmetro menor, apresentou contagens que não diferem significativamente dos resultados com células livres, não demonstrando vantagem em relação a aplicação direta do microrganismo no *smoothie*.

Conclusões

O microrganismo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* apresentou elevada viabilidade em bebida de alta acidez (*smoothie*) durante os 21 dias de armazenamento em refrigeração, tanto livre como encapsulado em alginato de cálcio.

A variação do diâmetro da cápsula não demonstrou influência significativa na sobrevivência do probiótico *Lactobacillus rhamnosus*. Na simulação gastrintestinal *in vitro*, o aumento no diâmetro da cápsula foi desfavorável à proteção da bactéria durante, principalmente, o final da simulação (fase íleo).

A encapsulação de *L. rhamnosus* em alginato de cálcio não demonstrou vantagem em relação a aplicação direta das bactérias ao *smoothie*, independentemente do seu diâmetro.

Referências Bibliográficas

- BOSCARIOLI, M. “Influência de prebióticos na encapsulação de bactérias probióticas adicionadas em sorvete.” Exame de Qualificação de Mestrado da Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, 2010.
- LEE, Y.K., e S. SALMINEN. *The coming of age of probiotics*. Vol. 6, em *Trends in Food Science & Technology*, 241-245. 1995.
- MADUREIRA, A. R., M. AMORIM, A. M. GOMES, M. E. PINTADO, e F. X. MALCATA. *Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions*. Vol. 44, em *Food Research International*, 465-470. 2011.
- MENEZES, C. R., et al. “Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas.” Em *Ciência Rural*, 1309-1316. 2013.
- SATHYABANA, S., K. RANJITH, P. BRUTHA, VIJAYABHARATHI. R., e V. BRINDHA. *Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment*. Vol. 57, em *Trends in food science and technology*, 419-425. 2014.
- STANTON, C., et al. “Market potential for probiotics.” *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2001: 476S-483S.
- TEIXEIRA, N. J. F. T. “Estudo da influência de amido resistente e do tempo de aeração na viabilidade de microrganismos probióticos em *smoothie* de frutas.” Dissertação, Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2012.
- VERRUCK, S., E.S. PRUDÊNCIO, C.R.W. VIEIRA, E.R. AMANTE, e R.D. de M.C AMBONI. *The buffalo Minas Frescal cheese as a protective matrix of Bifidobacterium BB-12 under in vitro simulated 88 gastrointestinal conditions*. Vol. 63, em *LWT - Food Science and Technology*, 1179-1183. 2015.