

Área: Ciência de Alimentos

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* ENCAPSULADO COM XANTANA PRUNI E COMERCIAL SOB CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS

**Izadora Almeida Perez*, Julia Borin Fioravante, Victoria de Moraes Gonçalves,
Patricia Diaz de Oliveira, Angelita da Silveira Moreira**

Laboratório de Biopolímeros, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas

**E-mail: izadora_perez@hotmail.com*

RESUMO – A busca por alimentos que geram benefícios ao consumidor é crescente, fator que gera avanços nas pesquisas para incorporação de probióticos em uma ampla diversidade de alimentos e bebidas. Entretanto, para que tais produtos gerem benefícios é necessário que os microrganismos probióticos permaneçam viáveis durante o processamento e condições de armazenamento. Como determinados alimentos possuem características que podem ser prejudiciais à essa viabilidade, diversas tecnologias são empregadas para assegurar a sobrevivência dos probióticos, dentre estas pode-se citar a encapsulação por *spray dryer*. Esse processo protege os microrganismos frente a diversos fatores, intrínsecos ao alimento e seu armazenamento e ao processo digestivo. Os agentes encapsulantes devem promover a viabilidade do microrganismo tanto no alimento como na parte superior do trato gastrointestinal; entre esses, destaca-se a xantana. Realizou-se dois tratamentos (T1 e T2); o microrganismo probiótico utilizado foi o *Lactobacillus acidophilus*, o agente encapsulante usado foi xantana, comercial (T1) e xantana pruni (T2), e o antiulectante/antiagregante Aerosil®. Para a encapsulação, o inóculo foi ressuspenso nas soluções encapsulantes, a secagem foi realizada em *spray dryer*, posteriormente, realizou-se a avaliação da resistência do microrganismo à digestão simulada. Com os resultados pôde-se observar que o microrganismo foi encapsulado e resistiu às condições simuladas, sendo que o período de maior liberação de microrganismos viáveis foi em 4 horas, a menor concentração de microrganismos foi em 2 horas, devido a liberação parcial, em ambos tratamentos. A xantana pode ser eficientemente utilizada como agente encapsulante de microrganismos probióticos, sendo que a xantana pruni apresentou melhores resultados.

Palavras-chave: probiótico, preservação, xantana, digestão simulada.

1 INTRODUÇÃO

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002). Inúmeros benefícios à saúde têm sido atribuídos à ingestão de probióticos, entretanto, tais benefícios somente ocorrem se os mesmos

permanecerem viáveis durante o processamento e condições de armazenamento. No Brasil, a legislação preconiza que a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante (MORTAZAVIAN; SOHRABVANDI, 2007; BRASIL, 2008).

É crescente a popularidade dos alimentos funcionais contendo probióticos, e os avanços nas pesquisas em desenvolvimento de novos produtos têm resultando na incorporação de probióticos não somente em produtos lácteos, como também em uma ampla diversidade de alimentos e bebidas (ALTAMIRANO-FORTOUL et al., 2012). É importante ressaltar que as diferentes características intrínsecas e extrínsecas dos alimentos podem ser prejudiciais à viabilidade dos microrganismos nesses produtos, assim diversas tecnologias são empregadas para assegurar a sobrevivência dos probióticos dentro de novas matrizes alimentares, dentre essas pode-se citar a técnica que utiliza secagem de soluções encapsulantes *por spray dryer*, uma das metodologias mais empregadas, uma vez que apresenta baixo custo do processo e possibilidade de emprego de uma ampla variedade de agentes encapsulantes com estabilidade do produto final (IBARRA et al., 2012; SANTOS, 2013). Esse processo é utilizado para proteger os microrganismos durante o armazenamento e também frente a meio ácidos, sais biliares, oxigênio e enzimas, fornecendo proteção às células frente a digestão (OLIVEIRA et al., 2007; FAREEZ et al. 2015). Utiliza-se uma matriz de baixa solubilidade e reconhecida como segura para garantir a integridade do microrganismo, tanto no alimento como na parte superior do trato gastrointestinal, sendo os biopolímeros ideais para este tipo de processo, destacando-se a xantana (KRASAEKOOPT et al., 2003; NAZZARO et al., 2012)

A xantana apresenta uma grande importância na indústria de alimentos devido às suas propriedades reológicas, as quais proporcionam a formação de soluções viscosas até mesmo em baixas concentrações e é estável em ampla faixa de pH e temperatura. Além disso, a goma xantana não é digerível (LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009). Denomina-se xantana pruni a xantana produzida por *X. arboricola* pv pruni, que possui propriedades químicas e físicas que a distinguem das xantanas comerciais (VENDRUSCOLO et al., 2013).

Objetivou-se com o presente estudo preservar o probiótico *Lactobacillus acidophilus* através da técnica de secagem por *spray dryer*, utilizando xantana pruni e xantana comercial como agente encapsulante, bem como avaliar a resistência do microrganismo às condições de digestão simulada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Tratamentos: o microrganismo probiótico utilizado foi o *L. acidophilus* ATCC 4356, fornecido pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCTA/FAEM/UFPeL. Nas soluções encapsulantes utilizou-se como agente encapsulante a xantana e o antiagregante/antiagregante Aerosil®, nas proporções 1,25% e 0,19%, respectivamente. No primeiro tratamento (T1) utilizou-se a xantana pruni da cepa 101, produzida no Laboratório de Biopolímeros, do CDTEC/UFPeL, segundo a patente WO/2006047845 (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 2006); no segundo tratamento (T2) substituiu-se a xantana pruni por uma comercial (Farmaquímica ®). Após, as soluções foram esterilizadas.

Encapsulação: o inóculo foi produzido através de culturas puras de *L. acidophilus* ATCC 4356; seu crescimento foi em placas de Petri com meio sólido MRS (De Man, Rogosa e Sharp), 37 °C por 72 h; após, as células foram ressuspensas em 30 mL de meio líquido MRS e incubadas em agitador orbital (Shaker) a 150 rpm, e 37 °C por cerca de 16 h, até que fosse atingida a DO_{600} (densidade óptica) igual a 1. Para separação das células e adição das mesmas na solução encapsulante, o inóculo foi centrifugado a $10000 \times g$ a 4 °C por 10 min para formação de *pellet* celular, que foi ressuspense em mesmo volume da solução encapsulante. A secagem foi realizada em *spray dryer* LabMaq (MSD 1.0), com temperatura de entrada de 120°C e de saída 60°C, fluxo de ar de $3L \cdot h^{-1}$ e velocidade de entrada de $0.4 L \cdot h^{-1}$. Os pós produzidos foram envasados em frascos tipo penicilina.

Resistência do microrganismo à digestão simulada: para avaliar a resistência do *L. acidophilus* ATCC 4356 encapsulado às condições de digestão simulada, amostras dos pós foram incubados para simular a peristalse; as condições foram 37°C a 150 rpm. Para a fase gástrica, foram pesados 1g de amostra em Erlenmeyer de 125 mL contendo 10 mL de solução ($6,2 g \cdot L^{-1}$ de NaCl, $2,2 g \cdot L^{-1}$ de KCl, $0,22 g \cdot L^{-1}$ de $CaCl_2$ e $1,2 g \cdot L^{-1}$ de $NaHCO_3$) acidificada a pH 2 com HCl 0,1 M e suplementada com $1 mg \cdot mL^{-1}$ de pepsina. Uma alíquota dessa solução foi retirada após 0,5, 1 e 2 horas para determinar a concentração dos microrganismos presentes através de diluições seriadas seguidas de plaqueamento (CASTELLI, 2011). Para avaliar a resistência às condições intestinais simuladas na fase entérica, na mesma solução, de forma subsequente, foram adicionados $1mg \cdot mL^{-1}$ de pancreatina, 0,2% de sais biliares e o pH ajustado em 8 com NaOH 0,1 M, e uma alíquota dessa solução foi retirada em 3, 4, 5 e 6 horas para determinar a concentração dos microrganismos como descrito anteriormente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na avaliação da resistência do probiótico *L. acidophilus* ATCC 4356 encapsulado com os diferentes agentes encapsulantes, sob condições de digestão simulada, estão demonstrados na Figura 1.

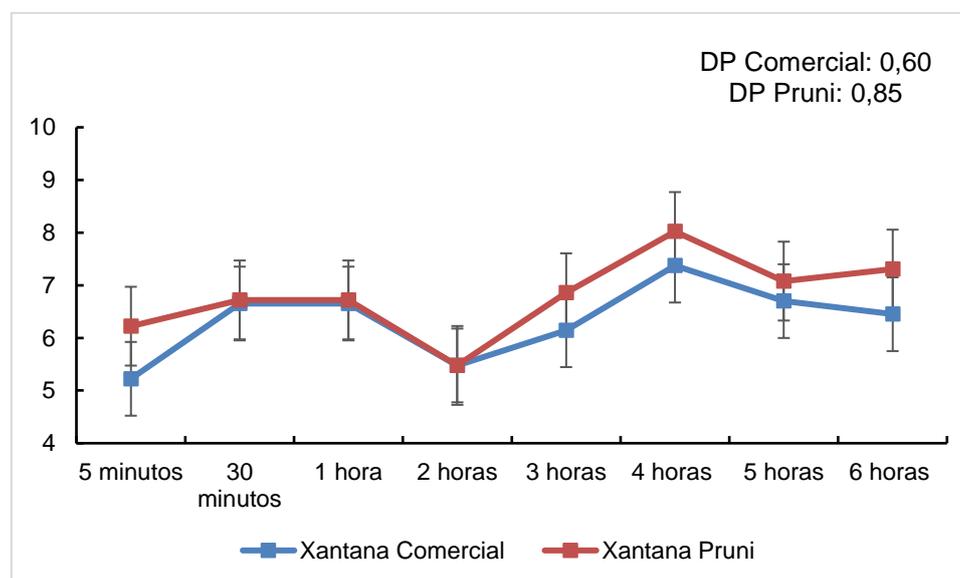


Figura 1 – Concentração de células viáveis nas microcápsulas submetidas a condições de digestão simulada (n=2), concentração das células viáveis foi expressa em log₁₀ UFC g⁻¹ (DP= desvio padrão).

Segundo Brasileiro (2011), a liberação do conteúdo das microcápsulas elaboradas com goma xantana se dá através de mecanismos térmicos e mecânicos, desta forma, ao longo da avaliação provavelmente ocorreu um aumento da dissolução das cápsulas, liberando os microrganismos de maneira lenta sob as condições de digestão simuladas. No presente trabalho obteve-se contagens em todos os tempos analisados; a menor concentração ocorreu às 2h, ao final da fase gástrica e o pico de liberação das cápsulas ocorreu no período de 4 h com concentrações de células viáveis de *L. acidophilus* de 10⁸ UFC no T2, com xantana pruni, e concentração de 10⁷ UFC no T1, com xantana comercial.

De acordo com Laurenti e Garcia (2013), assim que as cápsulas são submetidas à pH ácido com a presença de enzimas, as células do interior da matriz de encapsulação são gradualmente liberadas para o meio externo por este motivo, a liberação é menor no início do processo da simulação gastrointestinal e aumenta até atingir estabilidade.

Além de glicose, manose e ácido glicurônico, têm-se relatado a ocorrência de outros monossacarídeos na estrutura química de algumas xantanas não comerciais. Moreira et al. (2001) identificaram ramnose na xantana produzida por *X. arboricola pv pruni*, indicando que a espécie influencia na estrutura química. Além dessa diferença, as xantanas do patovar pruni, costumam apresentar maior pseudoplasticidade que as comerciais, o que é desejável para aplicações como a do presente estudo. Apesar da xantana comercial apresentar ótima qualidade tecnológica, a xantana pruni demonstrou um melhor resultado, com uma maior viabilidade das células em praticamente todos os períodos de contagem.

A sobrevivência das culturas probióticas quando utiliza-se a técnica de secagem por *spray dryer* não está somente relacionada com o agente encapsulante, mas também com o tipo de cepa utilizada, com as temperaturas de entrada e saída no equipamento, sendo que no processo as células são significativamente protegidas.

Para que os probióticos exerçam sua ação benéfica ao hospedeiro os mesmos devem chegar em concentrações adequadas ao intestino humano que é o seu ponto de ação. Silva et al. (2014) citam em seu estudo que um dos principais obstáculos para ação dos probióticos é a sua baixa taxa de sobrevivência em pH gástrico e altas concentrações de sais biliares no intestino. Os autores constataram que as células livres de *B. animalis e L. acidophilus* não resistiram as condições adversas do trato gastrointestinal (TGI), onde em 2 horas de análise os mesmos não apresentaram crescimento. Entretanto, com a encapsulação, os mesmos apresentaram maior resistência a passagem pelo TGI, mantendo a concentração celular em torno de 10⁹ UFC.g⁻¹ após 6 horas de análise.

4 CONCLUSÃO

O processo de encapsulamento em xantana com secagem por *spray drier*, nas condições utilizadas, proporciona a resistência em concentrações adequadas do probiótico *L. acidophilus ATCC 4356*, ao processo de digestão gástrica e entérica simulada. A xantana é, portanto, um biopolímero com potencial de utilização como agente encapsulante de microrganismos probióticos, especialmente a xantana pruni utilizada, que proporcionou os melhores resultados em toda a fase entérica.

5 AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Biopolímeros do Centro de Desenvolvimento Tecnológico onde realizei os experimentos e a Universidade Federal de Pelotas pelo apoio financeiro durante o meu estágio em iniciação científica.

6 REFERÊNCIAS

ALTAMIRANO-FORTOUL, R.; MORENO-TERRAZAS, R.; QUEZADA-GALLO, A.; ROSSEL, C. M. Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. **Food Hydrocolloide**, vol. 29, p. 166–74, 2012.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** 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>. Acesso em: 17 mar. 2018.

BRASILEIRO, J. S. L. **Microencapsulação de componentes bioativos: inovação em diferentes áreas.** 2011. 71f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Fernando Pessoa, Porto, 2011.

CASTELLI, R. M. **Sinergismo dos probióticos *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *Toyoi* sobre a imunomodulação em camundongos.** 2011. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, 2011.

FAREEZ, I. M.; LIM, S. M.; MISHRA, R. K.; RAMASAMY, K. Chitosan coated alginate–xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 1419–1428, 2015.

IBARRA, A.; ACHA, R.; CALLEJA, M. T.; CHIRALT-BOIX, A.; WITTIG, E. Optimization and shelf life of a low-lactose yogurt with *Lactobacillus rhamnosus* HN001. **Journal Dairy Science**, p. 3536–3548, 2012.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, p. 737-743, 2003.

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

LUVIELMO, M. M.; SCAMPARINI, A.R.P. Goma xantana: produção, recuperação, propriedades e aplicações. **Estudos tecnológicos**, v.5, nº 1, p. 50-67, 2009.

MORTAZAVIAN, A. M.; SOHRABVANDI, S. Probiotics and Food Probiotic Products. **Eta Publication**, p. 131-169, 2007.

MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; GIL-TUNES, C.; VENDRUSCOLO, C. T. Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv pruni. **Food Hyd.**, v. 15, p. 469-474, 2001.

NUNES, G. L.; SILVA, T. M.; HOLKEM, A. T.; SCHLEY, V.; MENEZES, C. R. Microencapsulação de culturas probióticas: princípios do método de spray drying. **Ciência e Natura** [da] Universidade Federal de Santa Maria. v.37, Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, p. 132 – 141, dez. 2015.

OLIVEIRA, A. C.; MORETTI, T. S.; BOSCHINI, C.; BALIERO, J. C. C.; FREITAS, O.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, p. 685-693, 2007.

SANTOS, R. C. S. dos. **Microencapsulação de Lactobacillus casei por spray drying**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2013.

VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Clima. **Process for preparing a xanthan biopolymer. International Patent WO/2006/047845**, 2006.

VENDRUSCOLO, C. T. ; MOREIRA, A. da S. . Xantana pruni: biopolímero de isolado de clima sub-tropical. In: Márcia do Vale Barreto Figueiredo;Deise Maria Passos da Silva;José de Paula Oliveira;José Nildo Tabosa;Fernando Gomes da Silva;José Teodorico de Araújo Filho. (Org.). **Estratégia para uma Agricultura Sustentável**. 04ed.Recife: CCS- Gráfica e Editora, v. 1, p. 31-58, 2013.