



## Caracterização físico-química e biológica de microcápsulas contendo *Saccharomyces boulardii* e *Enterococcus faecium*

### Physicochemical and biological characterization of microcapsules containing *Saccharomyces boulardii* and *Enterococcus faecium*.

Arthur Vinícius Alves dos Santos<sup>1</sup>, Ricardo Schneider<sup>2</sup>, Cleverson Busso<sup>3</sup>

#### RESUMO

Em razão do aumento do consumo e exportação de carne suína nos últimos anos, é importante encontrar métodos para melhorar a produtividade e qualidade deste produto, desta forma, os probióticos apresentam um grande potencial na melhora da saúde intestinal, além de causar a redução de patógenos comuns a estes animais. Cepas probióticas de *Saccharomyces boulardii* e *Enterococcus faecium*, foram selecionadas para encapsulamento em razão de sua ampla utilização como probióticos, assim como pelas suas propriedades benéficas ao hospedeiro. Concomitantemente a encapsulação dos probióticos, também foi adicionado uma proteína experimental parcialmente hidrolisada obtida a partir de vísceras de aves. O agente encapsulante escolhido foi o alginato de sódio e a cinética de liberação foi avaliada em um simulado gastrointestinal *in vitro* dissolvendo as microcápsulas em tampão glicina – HCl (pH 3,0) e tampão fosfato de sódio (pH 7,4). A microcápsula foi solubilizada unicamente em pH 7,4, apresentando uma concentração de liberação protéica 37 vezes maior em relação a solução de pH 3,0. As células probióticas permaneceram viáveis com a maior redução de apenas 1 log para *E. faecium*. Os resultados sugerem um potencial uso do produto na suplementação de animais.

**PALAVRAS-CHAVE:** cinética; encapsulação; probióticos.

#### ABSTRACT

Due to the increase in consumption and export of pork in recent years, it is important to find methods to improve the productivity and quality of this product, therefore, probiotics have great potential in improving intestinal health, in addition to reducing pathogens. common to these animals. Probiotic strains of *Saccharomyces boulardii* and *Enterococcus faecium* were selected for encapsulation due to their wide use as probiotics, as well as their beneficial properties to the host. Concomitantly with the encapsulation of probiotics, a partially hydrolyzed experimental protein obtained from bird viscera was also added. The encapsulating agent chosen was sodium alginate and the release kinetics were evaluated in an *in vitro* gastrointestinal simulation by dissolving the microcapsules in glycine – HCl buffer (pH 3.0) and sodium phosphate buffer (pH 7.4). The microcapsule was solubilized only at pH 7.4, presenting a protein release concentration 37 times higher compared to the pH 3.0 solution. The probiotic cells remained viable with the greatest reduction of just 1 log for *E. faecium*. The results suggest a potential use of the product in animal supplementation.

**KEYWORDS:** kinetics; encapsulation; probiotics.

#### INTRODUÇÃO

O Brasil é atualmente o quarto maior produtor e exportador de carne suína no mundo, com aproximadamente 4,98 milhões de toneladas do produto exportado somente no ano de 2022 (ABPA, 2023). Por se tratar de um produto economicamente relevante, é de suma importância que haja avanços nos rumos da nutrição desses animais, por conseguinte o uso de probióticos está se popularizando em vista dos benefícios à saúde como diminuição

<sup>1</sup> Bolsista do CNPQ. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail:santosarthur226@gmail.com. ID Lattes: 8880015297066138

<sup>2</sup> Docente do curso de Tecnologia em Processos Químicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil E-mail: rschneider@utfpr.edu.br. ID Lattes: 0680583757403350.

<sup>3</sup> Docente do curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail:cleversonbusso@utfpr.edu.br. ID Lattes: 5986131313813011.



da carga de patógenos comuns, uma vez que os microrganismos competem pelos nutrientes e receptores celulares (MARTINS et al. 2017).

Probióticos são conceitualmente definidos como microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (HILL et al., 2014). Atualmente, os probióticos comercializados geralmente apresentam somente um único microrganismo, entretanto, o uso de uma associação de probióticos como *Saccharomyces cerevisiae* e *Enterococcus faecium*, poderia resultar em efeitos ainda mais significativos, tendo em vista a combinação sinérgica e benéfica das diferentes propriedades destes organismos.

Embora o uso de probióticos na saúde animal apresente excelentes resultados, um dos maiores problemas é a redução da viabilidade/atividade celular ocasionada pela acidez durante a passagem pelo trato intestinal, desta forma, uma alternativa seria o uso da microencapsulação, que consiste em “empacotar” substâncias sólidas, líquidas ou gasosas com inúmeros agentes encapsulantes. Um desses agentes é o alginato, uma molécula que em solução iônica é capaz de formar uma estrutura na forma de cápsula e assim manter a estabilidade e liberação controlada do produto contido em seu núcleo. Além disso, essa cápsula apresenta insolubilidade em condições ácidas (DUBEY; SHAMI; RAO, 2009), o que é vantajoso quando se quer preservar algum componente ao atravessar o trato gástrico de animais monogástricos, que é extremamente ácido.

Além do uso da matriz de alginato para proteção e entrega dos probióticos, uma possível estratégia a ser abordada é o uso de uma proteína hidrolisada como fonte de substrato para os microrganismos. Neste intuito, uma proteína experimental parcialmente hidrolisada e obtida a partir de vísceras de frango foi utilizada como um potencial substrato de aminoácidos essenciais para o desenvolvimento e manutenção de microrganismos probióticos encapsulados com alginato. A viabilidade celular dos probióticos, a integridade das microcápsulas a diferentes pHs e a curva de cinética de liberação do conteúdo proteico, foram os principais parâmetros avaliados neste estudo.

## METODOLOGIA

### PREPARO DOS INÓCULOS

#### *Saccharomyces boulardii*

A cepa de *S. boulardii* foi obtida comercialmente (Repoflor®) e o pó liofilizado foi semeado em uma placa de petri contendo ágar YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) e incubada em estufa à  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 72 horas. Posteriormente, uma colônia de *S. boulardii* foi isolada e incubada em caldo YPD à  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ , com agitação orbital de 150 rpm, por 72 horas. Após este processo, as células foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em 10 mL de solução salina 0,85% (m/v).

#### *Enterococcus faecium*

O preparo do inóculo de *E. faecium* foi realizado semeando  $1\text{cm}^2$  do pó liofilizado em uma placa contendo ágar LB (*Luria Bertani*), esta foi incubada à  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, após este processo, uma colônia foi isolada do meio de cultura e inoculada em 250 mL de caldo LB e incubada à  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  com agitação orbital de 150 rpm, por 18 horas. Em seguida as células foram centrifugadas, lavadas e resuspensas em 250 mL de caldo LB, o meio de cultura foi incubado nas mesmas condições do processo anterior, porém, por 8 horas. Ao



final deste processo, as células foram centrifugadas, lavadas e suspensas em solução salina 0,85% (m/v).

## ENCAPSULAMENTO DO PROBIÓTICO

As microcápsulas foram obtidas pela técnica de gelificação iônica que consiste no gotejamento de uma solução contendo alginato de sódio (1,5%). Em combinação com o alginato, utilizou-se uma proteína experimental parcialmente hidrolisada de vísceras de frango, cedida gentilmente pela empresa de nutrição animal Falbom, na proporção de 2%, além de células de *S. boulardii* e *E. faecium* ajustadas na escala 0,5 Macfarland (aproximadamente  $10^8$  UFC/mL). A solução foi agitada por 20 minutos para completa incorporação do material à matriz gelificante, o processo de encapsulamento foi realizado sob condições assépticas, o sistema foi montado de acordo com a Figura 1-A, onde a mistura foi gotejada em uma solução de  $\text{CaCl}_2$  2% mantido em agitação constante, após formação dos hidrogéis, as cápsulas foram colocadas em ultra freezer por 12 horas e posteriormente foram liofilizadas por 48 horas, após o término do processo, as cápsulas foram mantidas em refrigerador a 6°C.

## AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DOS MICRORGANISMOS E EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO

Foram separadas alíquotas de 1mL das soluções APS (Alginato + Proteína + *S. boulardii*) e APE (Alginato + Proteína + *E. faecium*), assim como 100 mg de cápsulas feitas a partir das soluções. Para as alíquotas das soluções APS e APE, foram feitas diluições seriadas de ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) além disto, 100 mg de cada cápsula foi diluído em 900  $\mu\text{L}$  de solução de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,5) estéril e submetidas a diluições seriadas. As placas contendo *S. boulardii* ficaram por 48 horas à 27°C e as placas contendo *E. faecium* ficaram por 24 horas à  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , posteriormente as colônias formadas foram contadas e a eficiência de incorporação foi expressa em porcentagem, assim como realizado por Annan, Borza e Hansen (2008), equação 1:

$$EI = \frac{N}{N_0} \times 100 \quad (1)$$

Onde: N = Número de células viáveis nos encapsulados (Log UFC/g), e  $N_0$  = Número de células viáveis nas soluções antes do encapsulamento (Log UFC/mL).

## AVALIAÇÃO DA CURVA DE CINÉTICA DE LIBERAÇÃO

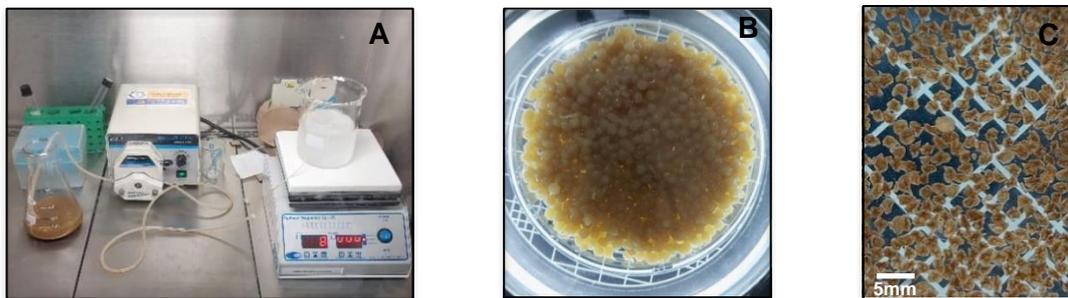
A princípio foram diluídos 420 mg de encapsulados em duas soluções tampão, a fim de simular e avaliar o comportamento do probiótico em pH estomacal e intestinal de suínos. Para a solução 1 foram utilizados 560 mL de tampão glicina – HCl 0,1 M (pH 3,0) e para a solução 2, 560 mL de tampão fosfato de sódio (pH 7,4). Ambas as soluções contendo os probióticos foram colocadas em shaker por 24 horas à 130 rpm e  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , e amostras foram coletadas nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 360, 480, 720 e 1440 minutos, totalizando 13 amostras. Após este procedimento, foi realizada uma varredura no espectrofotômetro utilizando a proteína hidrolisada a fim de encontrar o comprimento de onda de maior absorção da molécula e posteriormente foi construída uma curva padrão para quantificação das amostras e para realização da cinética de liberação proteica.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### ENCAPSULAMENTO DO PROBIÓTICO

Os probióticos encapsulados apresentaram formato discoide e coloração marrom por conta da presença da proteína hidrolisada. Após o processo de gotejamento na solução de  $\text{CaCl}_2$  as cápsulas apresentaram um aspecto gelatinoso (Figura 1-B) e possuíam tamanho maior do que após o processo de liofilização (Figura 1-C), devido a perda de água.

Figura 1 – (A) Sistema para encapsulamento dos probióticos. (B) Cápsulas antes da liofilização. (C) Cápsulas depois da liofilização.

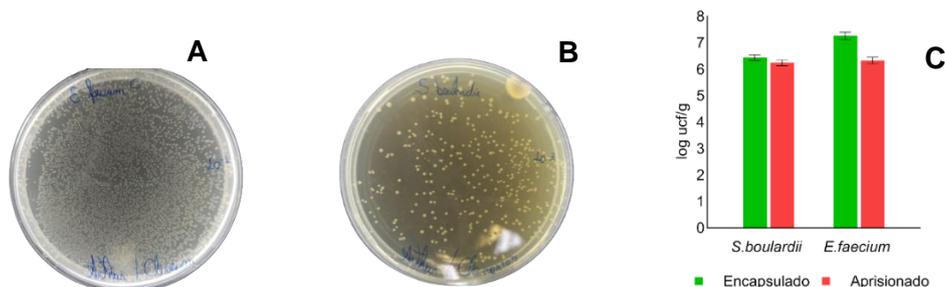


Fonte: Autoria própria (2023).

### AValiação DA VIABILIDADE DOS MICRORGANISMOS E EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO

A avaliação da viabilidade e da EI (Eficiência de Incorporação) obtida para *S. boulardii* foi de 95,06% e para *E. faecium* de 88,54%. As contagens das colônias foram realizadas em triplicata (Figuras 2-A e 2-B) e um comparativo entre as colônias encapsuladas x aprisionadas foi representado na figura 2-C. Os resultados foram satisfatórios, em comparação com Annan, Borza e Hansen (2008), onde o valor de EI obtido para o encapsulamento de *Bifidobacterium adolescentis* foi de 41 a 43%. Os valores de EI desta forma corroboram com uma baixa perda de viabilidade/atividade e são bons indicativos para uma melhora na eficiência do processo devido ao uso da proteína hidrolisada.

Figura 2 - (A) Células de *E. faecium* em placas, na diluição de  $10^{-1}$ . (B) Células de *S. boulardii* em placas, na diluição de  $10^{-3}$ . (C) Gráfico de concentrações de células encapsuladas x aprisionadas.



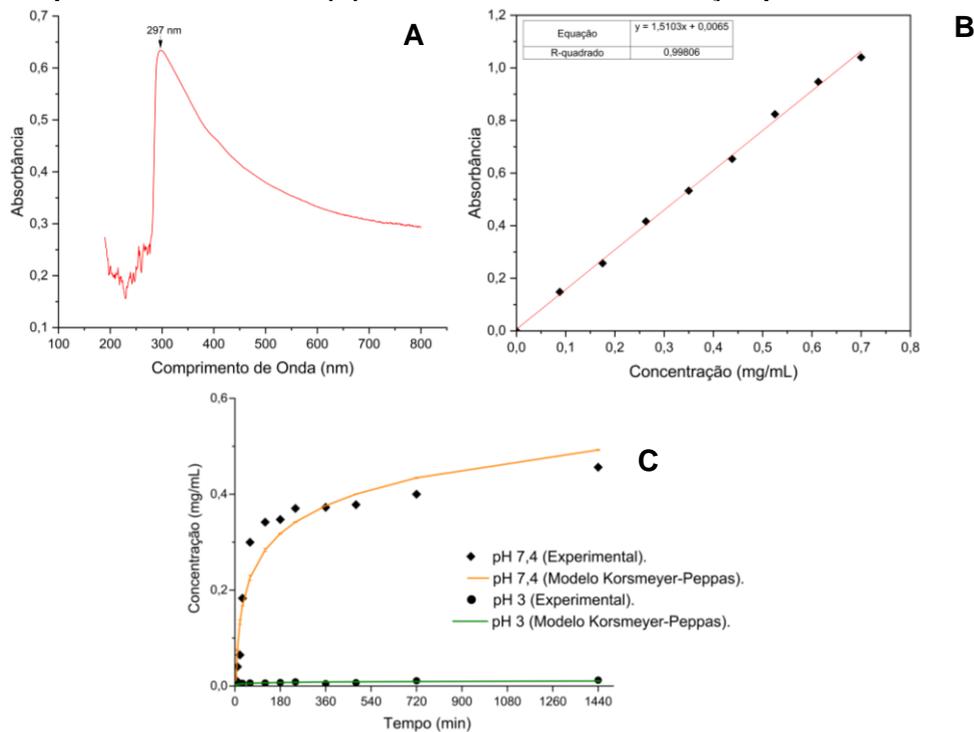
Fonte: Autoria própria (2023).



## AVALIAÇÃO DA CURVA DE CINÉTICA DE LIBERAÇÃO PROTEICA

Após realização da varredura nos comprimentos de onda de 180 nm – 800 nm (Figura 3-A), observa-se que o comprimento de onda relacionado à proteína hidrolisada é de 297 nm. Este dado possibilitou a construção de uma curva padrão para posterior quantificação dos compostos, assim como mostrado na figura 3-B, a partir da equação da reta e do coeficiente  $r^2 = 0,99806$ , onde foi possível construir a curva de cinética de liberação da proteína (Figura 3-A).

Figura 3 – (A) Varredura da proteína nos comprimentos de 180 nm – 800 nm. (B) Curva padrão da proteína hidrolisada. (C) Curva de cinética de liberação proteica.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Para avaliação da cinética de liberação da proteína, deve ser levada consideração as diferenças nas taxas de dissolução das cápsulas nos diferentes pHs submetidos, assim, como um ajuste a partir da utilização de um modelo matemático como o de Korsmeyer-Peppas (equação 2), que leva em consideração que o mecanismo de liberação de um fármaco demonstra comportamento anômalo, o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) (equação 3) também foi calculado a fim de correlacionar o modelo matemático com os dados experimentais.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = a \cdot t^n \quad (2)$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i^{MOD} - Y_i^{EXP})^2}{\sum_{i=1}^n (Y_i^{MOD} - \bar{Y})^2} \quad (3)$$

Os valores de  $R^2$  calculados, indicam a aproximação dos dados experimentais ao modelo matemático com  $R^2$  de 0,9371 para as cápsulas em pH 7,4 e de 0,9620 para pH 3,0. As medidas das concentrações finais de proteína nas soluções, apresentaram como



resultados 0,01225 mg/mL para a solução de pH 3,0 e de 0,45631 mg/mL para pH 7,4, o que evidencia uma liberação proteica 37 vezes maior em pH intestinal em relação ao pH estomacal, demonstrando que a matriz de alginato é um ótimo biopolímero para entrega dos probióticos em sistemas biológicos através da sua propriedade de retenção em meio ácido e de liberação em meio alcalino.

## CONCLUSÃO

O desenvolvimento de uma microcápsula de alginato contendo dois probióticos *Saccharomyces boulardii* e *Enterococcus faecium* e a associação desta matriz com uma proteína parcialmente hidrolisada obtida de vísceras de frango, foi capaz de proteger e otimizar a entrega dos microrganismos em uma condição similar ao trato intestinal de suínos. Diante das propriedades reconhecidas destes probióticos e a fonte de aminoácidos da proteína em estudo, os resultados sugerem a potencialidade de uso do produto na suplementação de animais, como a suinocultura, o que pode conferir proteção contra os ácidos estomacais, sais biliares e enzimas, evitando uma grande perda de viabilidade destes microrganismos.

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao CNPQ pela bolsa concedida, assim como a Central Analítica da UTFPR pelo auxílio nos processos, a Unioeste pela disponibilização do espaço e dos equipamentos para realização dos experimentos, ao meu orientador Dr. Cleverson Busso, assim como ao Dr. Elissandro Klein e ao João Baptista pelo auxílio nos experimentos e a Falbom Nutrição Animal por ter fornecido as proteínas utilizadas no experimento.

## Conflito de interesse

Não há conflito de interesse

## REFERÊNCIAS

ANNAN, N. T.; BORZA, A. D.; HANSEN, L. T. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. **Food Research International**, v. 41, n. 2, p. 184–193, jan. 2008.

ANUAL, ABPA Relatório (2022). Associação Brasileira de Proteína Animal. p.73-74.

DUBEY, R.; SHAMI, T. C.; RAO, K. U. B. Microencapsulation Technology and Applications. **Defence Science Journal**, v. 59, n. 1, p. 82–95, 2009.

HILL, C. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, ago. 2014.

MARTINS, A. D. DE O. et al. Salmonella sp em suínos alimentados com probiótico e promotores de crescimento. **Higiene Alimentar**, v. 31, n. 268/269, p. 111–115, maio 2017.