



Microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* por atomização empregando pectina e concentrado proteico de soro de leite

Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* by atomization using pectin and whey protein concentrate

Maria Eduarda Cordeiro Silva¹, Miriam Cristina da Silva Gomes², Deisy Alessandra Drunkler³

RESUMO

Os probióticos são alvo de interesse na indústria alimentícia pelos seus benefícios à saúde. Para superar a baixa viabilidade, a microencapsulação é utilizada. Logo, o trabalho teve por objetivo avaliar a microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* utilizando pectina de baixo teor de metoxilação (BTM) e concentrado proteico de soro de leite (CPS) como materiais de parede por *spray drying* quanto a eficiência da encapsulação, caracterização química e físico-química, morfologia, Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e viabilidade. Para tal, foram elaborados dois tratamentos: T1: 1:7 BTM:CPS (%m/m) e T2: 0,5:7,5 BTM:CPS (%m/m). Ambos os tratamentos apresentaram elevada eficiência de encapsulação, propriedades morfológicas, químicas e físico-químicas compatíveis com produtos obtidos por atomização. Quanto ao diâmetro, este foi de $4,3 \pm 0,02 \mu\text{m}$ para T1 e $4,4 \pm 0,02 \mu\text{m}$ para T2. Pelos espectros obtidos no FTIR, é possível inferir a associação entre os materiais de parede e uma possível microencapsulação do probiótico. Quanto à viabilidade, ambos os tratamentos superaram as células livres, mantendo-se viáveis por 45 dias à temperatura ambiente e 60 dias em refrigeração. Conclui-se que a microencapsulação com pectina BTM e CPS por atomização foi eficaz na produção de microcápsulas e no aumento da viabilidade do *L. acidophilus*.

PALAVRAS-CHAVE: probiótico; *spray drying*; viabilidade de células.

ABSTRACT

Probiotics are of interest in the food industry due to their health benefits. To overcome low viability, microencapsulation is employed. Therefore, the study aimed to evaluate the microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* using low methoxyl pectin (LMP) and whey protein concentrate (WPC) as wall materials through *spray drying*, regarding encapsulation efficiency, chemical and physicochemical characterization, morphology, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), and viability. Two treatments were prepared: T1: 1:7 LMP:WPC (% m/m), and T2: 0.5:7.5 LMP: WPC (% m/m). Both treatments exhibited high encapsulation efficiency and morphological, chemical, and physicochemical properties compatible with atomized products. The diameter was $4.3 \pm 0.02 \mu\text{m}$ for T1 and $4.4 \pm 0.02 \mu\text{m}$ for T2. FTIR spectra suggest an association between the wall materials and potential probiotic microencapsulation. Regarding viability, both treatments outperformed free cells, remaining viable for 45 days at room temperature and 60 days under refrigeration. In conclusion, microencapsulation using LMP and WPC by atomization effectively produced microcapsules and enhanced the viability of *L. acidophilus*.

KEYWORDS: probiotic; *spray drying*; cell viability.

¹Bolsista da CNPq, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil. E-mail: marias.2000@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 4053013586711598

²Discente do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, multicampi Campo Mourão-Medianeira, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil. E-mail: miriam_mmsg@hotmail.com. ID Lattes: 8522963365300792

³Docente do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, multicampi Campo Mourão-Medianeira, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil. E-mail: deisydrunkler@utfpr.edu.br. ID Lattes: 1887851918491484



INTRODUÇÃO

O uso de probióticos, em especial de *L. acidophilus*, quando em quantidades suficientes e determinada frequência, traz inúmeros benefícios para a saúde que impactam positivamente na qualidade de vida das pessoas. Para que esses organismos tenham eficácia eles precisam chegar vivos e em uma certa quantidade no intestino grosso do hospedeiro; no entanto, são sensíveis a condições de armazenamento e transporte o que resultam em baixa viabilidade (Liu *et al.*, 2023). A microencapsulação tem se mostrado uma estratégia eficaz para a proteção dessas bactérias, em especial a técnica de *spray drying*, por ter baixo custo e alta eficiência (Martín *et al.*, 2015). Dentre os materiais de parede, a pectina e o concentrado proteico de soro de leite têm se destacado como importantes materiais de parede (Aberkane *et al.*, 2014, Chen *et al.*, 2023)

Frente ao exposto, o objetivo deste estudo foi microencapsular e caracterizar as microcápsulas de *L. acidophilus* obtidas por atomização a partir de pectina de baixo teor de metoxila (BTM) e concentrado proteico de soro de leite (CPS) quanto a eficiência da encapsulação, propriedades químicas e físico-químicas, morfologia e viabilidade de *L. acidophilus* sob condições de armazenamento durante 90 dias nas temperaturas de 4 °C e 25 °C.

MATERIAIS E MÉTODOS

MICROENCAPSULAÇÃO DE *L. acidophilus* LA-3 POR ATOMIZAÇÃO UTILIZANDO PECTINA E CONCENTRADO PROTEICO DE SORO COMO AGENTES ENCAPSULANTES.

A cultura do *L. acidophilus* LA3 (1% m.v⁻¹) foi ativada em caldo MRS (De Man Rogosa and Sharpe, Merck, Darmstadt, Alemanha) até atingir a fase exponencial. A seguir, a cultura foi centrifugada (3000 rpm por 10 min a 4 °C), o sobrenadante descartado e lavado por duas vezes com solução de água peptonada 0,1%. O microrganismo foi suspenso nas soluções de pectina BTM e CPS, na proporção de 1:7 (% % m/m) BTM: CPS para o tratamento 1 (T1) e 0,5:7,5 (% m/m) BTM: CPS para o tratamento 2 (T2) e submetidos a microencapsulação por *spray drying* (SDi 1.0, Labmaq do Brasil, São José do Rio Preto, SP, Brasil), sob condições constantes de pressão do compressor 2-4 kgf cm⁻², temperatura do ar de entrada 110 °C; vazão: 0,40 L/min; fluxo de alimentação: 0,45 L/h e diâmetro de saída do ar no sistema (1 mm) com bico duplo fluído. As micropartículas foram coletadas na base do ciclone e armazenadas sob refrigeração (4 °C ± 1 °C) e temperatura ambiente (25 °C ± 1 °C).

ENUMERAÇÃO DO *L. acidophilus* E DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA ENCAPSULAÇÃO

A enumeração do *L. acidophilus*, livre e microencapsulado, e a eficiência de encapsulação seguiram o disposto por Corti, Bittencourt e Drunkler (2017).

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, FÍSICO-QUÍMICA E MORFOLÓGICA DAS MICROCÁPSULAS.

As microcápsulas foram caracterizadas quanto: umidade (AOAC, 2007); atividade de água (aw), em equipamento determinador de atividade de água (Aqualab® 4TE, Decagon, São Paulo, Brasil); higroscopicidade (Pinto, 2016); solubilidade (Nascimento, 2018); morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e o diâmetro médio



utilizando luz dispersa. A espectroscopia de absorção na região de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada com as microcápsulas, os materiais de parede e o microrganismo livre.

SOBREVIVÊNCIA DE *Lactobacillus acidophilus* LIVRE E MICROENCAPSULADO ARMAZENADOS EM TEMPERATURA DE REFRIGERAÇÃO E AMBIENTE.

A avaliação da sobrevivência dos probióticos, microencapsulado, e livre foi realizada logo após a obtenção (0 dia) e após 15, 30, 45, 60 e 90 dias de armazenamento em incubadora BOD com controle de temperatura a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, em frasco âmbar fechado, na presença de oxigênio e ausência da luz, por contagem de células viáveis (Albadran *et al.*, 2015).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e, quando detectadas diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de 5% de significância, ao Teste de *Tukey*, utilizando o programa computacional *Statistica 7*.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A eficiência de encapsulação não mostrou diferenças significativas entre os tratamentos, com T1 alcançando $82,50 \pm 1,82\%$ e T2 obtendo $80,91 \pm 1,02\%$. Esses valores se assemelham a outros estudos que encapsularam *L. acidophilus* (Menezes *et al.*, 2019).

Os valores de atividade de água foram ligeiramente maiores para T1 ($0,43 \pm 0,11$) em comparação com T2 ($0,36 \pm 0,03$), mas ambos estavam dentro dos limites aceitáveis para produtos atomizados e para manter a viabilidade celular (Favaro-Trindade *et al.*, 2010). A umidade das microcápsulas estava próxima do limite recomendado, com T1 em $5,46 \pm 0,61\%$ m/m e T2 em $4,42 \pm 0,24\%$ m/m (Ilha *et al.*, 2015; Peighambaroust *et al.*, 2011). A solubilidade (T1: $78,23 \pm 3,56\%$ e T2: $74,61 \pm 2,08\%$) e a higroscopicidade (T1: $11,04 \pm 0,58$ e T2: $12,28 \pm 1,45\%$) não foram afetadas pelas diferentes concentrações de materiais de parede e não diferiram entre os tratamentos ($p > 0,05$).

As micrografias das microcápsulas mostraram formato arredondado e superfície irregular, características típicas de produtos secos por atomização. Não foram observadas células livres, indicando uma efetiva microencapsulação (Fritzten-Freire *et al.*, 2012). O diâmetro médio das partículas não diferiu entre os tratamentos ($p > 0,05$) (T1: $4,3 \pm 0,02\text{ }\mu\text{m}$ e T2: $4,2 \pm 0,02\text{ }\mu\text{m}$) e estava de acordo com a literatura consultada (Saavetra *et al.*, 2015).

Os espectros de FTIR demonstraram a preservação dos materiais da parede após serem submetidos à secagem por atomização. A atenuação da região Amida II do CPS (Drosou; Krokida; Biliaderis, 2018) e o estiramento COO- de ambas as pectinas (Moghbeli *et al.*, 2020) indicam interação entre os agentes encapsulantes. As bandas correspondentes aos componentes da célula bacteriana, nas faixas entre 3.000 cm^{-1} a 2.800 cm^{-1} (Oust *et al.*, 2004), correspondentes aos ácidos graxos da membrana celular bacteriana, não são mais visíveis após a microencapsulação.



A viabilidade do probiótico, livre e microencapsulado, ao longo do armazenamento encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Viabilidade de células de *Lactobacillus acidophilus* livres e microencapsuladas (Log UFC.g⁻¹) em diferentes concentrações de pectina e concentrado proteico de soro de leite pelo método de *spray drying* em condições de estocagem refrigerada e à temperatura ambiente

Tratamento		Refrigeração a 4 °C		
Tratamento	Célula livre	T1	T2	
Tempo (dias)				
0	9,75 ± 1,01 ^{aA}	8,03 ± 0,63 ^{aB}	7,90 ± 0,88 ^{aB}	
15	6,40 ± 0,05 ^{bA}	7,07 ± 0,65 ^{aA}	6,92 ± 0,40 ^{bA}	
30	5,63 ± 0,2 ^{bB}	7,51 ± 0,65 ^{aA}	7,20 ± 0,64 ^{abA}	
45	< 10 ⁻²	7,58 ± 0,65 ^{aA}	7,09 ± 0,35 ^{abB}	
60	< 10 ⁻²	7,14 ± 0,70 ^{aA}	7,28 ± 0,35 ^{abA}	
90	< 10 ⁻²	< 10 ⁻²	< 10 ⁻²	
Temperatura		Ambiente a 25 °C		
Tratamento	Célula livre	T1	T2	
Tempo (dias)				
0	9,75 ± 1,01 ^{aA}	8,03 ± 0,63 ^{aB}	7,90 ± 0,88 ^{aB}	
15	< 10 ⁻²	7,26 ± 1,05 ^{abA}	7,33 ± 0,91 ^{abA}	
30	< 10 ⁻²	6,89 ± 1,12 ^{bA}	6,18 ± 0,94 ^{bA}	
45	< 10 ⁻²	6,25 ± 0,80 ^{bA}	6,57 ± 0,47 ^{bA}	
60	< 10 ⁻²	< 10 ⁻²	< 10 ⁻²	
90	< 10 ⁻²	< 10 ⁻²	< 10 ⁻²	

Médias ± erro padrão seguidas por letras iguais, minúsculas na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade (Teste de *Tukey*). T1 = 1:7 BTM:CPS (m/m). T2 = 0,5:7,5 BTM:CPS (m/m).

Fonte: Autoria própria (2023).

O probiótico microencapsulado manteve a viabilidade por um tempo maior quando comprado a forma livre, tanto à temperatura ambiente quanto de refrigeração (Tabela 1). Menezes *et al.* (2019) obtiveram valores de 5,94±0,10 a 9,44±0,02 UFC/g em 45 dias de armazenamento quando utilizado extrato aquoso de soja e maltodextrina como agentes encapsulantes, valores similares aos encontrados nesse estudo (T1: 7,58±0,65 e T2: 7,09±0,35 UFC/g). No entanto, no presente estudo, foi obtido viabilidade até o dia 60 do armazenamento para temperatura de refrigeração.

CONCLUSÕES

A microencapsulação de *L. acidophilus* por *spray drying* com o emprego de pectina BTM e concentrado proteico de soro de leite como materiais de parede resultaram em boa eficiência de encapsulação, propriedades químicas, físico-químicas e morfológicas de acordo com produtos atomizados similares, assim como maior viabilidade durante o armazenamento quando comprado às células livres. Logo, os resultados demonstraram viabilidade na produção das microcápsulas pela técnica de *spray drying* com os materiais de parede empregados.



Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa de iniciação concedida à primeira autora; aos laboratórios mutiusuários pelas análises realizadas: CEANMED-MD-UTFPR, LABMULTI-LD-UTFPR e UNILA. Este estudo foi financiado em parte pela CAPES - Brasil, Código de Financiamento 001.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

ABERKANE, L.; ROUDAUT, G.; SAUREL, R. Encapsulation and oxidative stability of pufarich oil microencapsulated by spray drying using pea protein and pectin. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 5, p. 1505-1517, 2014.

ALBADRAN, H.A. *et al.* Stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* in dry microcapsules under accelerated storage conditions. **Food Research International**, v.74, p.208-216, 2015.

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**. 18.ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC International, 2007.

CHEN, L. *et al.* Fabrication of whey protein/pectin double layer microcapsules for improving survival of *Lacticaseibacillus rhamnosus* ZFM231. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 242, part 4, 2023.

CORTI, D. *et al.* Use of milk protein and maltodextrin in the microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus*: a model approach. **Acta Scientiarum. Technology**, v.39, 2017.

DROSOU, C. *et al.* Composite pullulan-whey protein nanofibers made by electrospinning: Impact of process parameters on fiber morphology and physical properties. **Food Hydrocolloids**, v.77, p.726-735, 2018.

FAVARO-TRINDADE, C.S. *et al.* The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. **Food Hydrocoll** v. 24(4), p. 336–340, 2010.

FRITZEN-FREIRE, C.B., *et al.* Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. **Food research international**, v. 45 (1), p. 306–312, 2012.

ILHA, E.C., *et al.* *Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey. **Eur Food Res Technol** v. 240(5), p. 977–984, 2015.



LIU, L., *et al.* Stress tolerance and characterization of biofilm-like probiotic bacteria encapsulated in calcium pectin beads. **LWT**, v. 184, 2023.

MARTÍN, M. J., *et al.* Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v. 27, p. 15-25, 2015.

MENEZES, L. A. A., *et al.* Soy extract and maltodextrin as microencapsulating agents for *Lactobacillus acidophilus*: a model approach. **Journal of Microencapsulation**, v.35. p. 7-8, 705-719, 2019.

MOGHBELI, S. *et al.* A Taguchi approach optimization of date powder production by spray drying with the aid of whey protein-pectin complexes. **Powder Technology**, v.359, p.85-93, 2020.

NASCIMENTO, K.M. **Desenvolvimento de microcápsulas de compostos bioativos de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (mart.) coville) para aplicação em filmes biodegradáveis ativos**. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018.

OUST, A. *et al.* FT-IR spectroscopy for identification of closely related lactobacilli. **Journal of Microbiological Methods**, v.59, p.149-162, 2004.

PEIGHAMBARDoust, S.H., *et al.* Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. **Trends Food Sci Technol** v. 22(5), p. 215–224, 2011.

PINTO, S.S. *et al.* Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect Bifidobacterium-BB-12 microencapsulated by spray drying. **Food Research International**, v.67, p.400-408, 2016.

SAAVEDRA, J.P., *et al.*, Microstructural properties and distribution of components in microparticles obtained by spray drying. **Journal of food engineering**, v. 152, p. 105–112, 2015.