



Avaliação do comportamento de *L. acidophilus* microencapsulado por atomização empregando pectina e concentrado proteico de soro de leite em modelo de digestão in vitro

Evaluation of the behavior of *L. acidophilus* microencapsulated by atomization using pectin and whey protein concentrate in an in vitro digestion model

Isabella Gomes Pedro¹, Miriam Cristina da Silva Gomes², Deisy Alessandra Drunkler³

RESUMO

Os probióticos, incluindo o *L. acidophilus*, são valorizados por seus benefícios à saúde humana, mas seu uso em alimentos enfrenta desafios, em especial, a necessidade de garantir a chegada de um número de microrganismos viáveis ao trato digestório. A microencapsulação por *spray drying* é uma das técnicas empregadas que contribuem para com o aumento da viabilidade. Frente ao exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade do *L. acidophilus* microencapsulado por *spray drying* utilizando pectina de baixo teor de metoxilação (BTM) e concentrado proteico de soro de leite (CPS) como materiais de parede frente a um sistema de digestibilidade *in vitro*. Para tal, foram elaborados dois tratamentos: tratamento 1 (T1: 1:7 BTM: CPS % m/m) e tratamento 2 (T2: 0,5:7,5 BTM: CPS % m/m) que juntamente com as células livres foram submetidas a passagem por um sistema que mimetizava o trato digestório e, posteriormente, enumeradas. Ambos os tratamentos apresentaram melhor desempenho, garantindo a viabilidade do probiótico ao final do trato digestório (79,96% e 71,95% para T1 e T2, respectivamente), ao passo que as células livres não se mantiveram viáveis.

PALAVRAS-CHAVE: Probiótico; Sistema digestório *In Vitro*; Viabilidade.

ABSTRACT

Probiotics, including *L. acidophilus*, are valued for their benefits to human health, but their use in foods faces challenges, in particular, the need to ensure the arrival of a number of viable microorganisms to the digestive tract. Microencapsulation by spray drying is one technique that contributes to increasing viability. Given the above, the objective of this work was to evaluate the viability of *L. acidophilus* microencapsulated by spray drying using low methoxylated pectin (LMP) and whey protein concentrate (WPC) as wall materials in a digestibility system. *in vitro*. To this end, two treatments were developed: treatment 1 (T1: 1:7 LMP: WPC % m/m) and treatment 2 (T2: 0.5:7.5 LMP: WPC % m/m) which, together with the cells free animals were subjected to passage through a system that mimicked the digestive tract and were subsequently enumerated. Both treatments showed better performance, ensuring the viability of the probiotic at the end of the digestive tract (79.96% and 71.95% for T1 and T2, respectively), while free cells did not remain viable.

KEYWORDS: Probiotic; In Vitro Digestive System; Viability.

¹ Voluntária da UTFPR. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil. E-mail isabellagomes@alunos.utfpr.com.br. ID Lattes: 7307852331982628

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

³ Docente 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

Os probióticos podem ser definidos como microrganismos vivos que, quando consumidos regularmente e em quantidades adequadas e suficientes, promovem efeitos benéficos à saúde do consumidor e ao seu bem-estar (HILL *et al.*, 2014). Entretanto, para tal, é necessário que resistam não somente ao beneficiamento e armazenamento quanto à passagem pelo trato digestório (SOUZA *et al.*, 2020).

A técnica de microencapsulação pode ser utilizada para esta finalidade e consiste em envolver as partículas, neste caso os probióticos, com um material encapsulante, resultando em cápsulas de estrutura simples, frequentemente esféricas, com membranas semipermeáveis e resistentes (BRAND, 2019). O *spray drying* é uma técnica de microencapsulação promissora que permite o controle das condições de secagem para ajustar o tamanho e a forma das partículas. É econômico, adequado para produção em grande escala e oferece alta estabilidade para probióticos, com mínima degradação celular quando otimizado (BARRO *et al.*, 2021).

Os materiais de parede exercem importância na estabilidade das microcápsulas. O concentrado proteico de soro oferece valor nutricional e propriedades funcionais, mas é sensível às condições ambientais. Por outro lado, a pectina é um polissacarídeo aniônico estável disponível em várias fontes. A interação entre eles resulta em um complexo com diversas propriedades funcionais, como emulsificação, gelificação, estabilidade térmica, solubilidade e atividade biológica, aprimorando seu potencial como material de revestimento na microencapsulação (DU *et al.*, 2022).

Logo, o objetivo do trabalho foi avaliar a viabilidade do *L. acidophilus* microencapsulado por atomização utilizando pectina de baixo teor de metoxilação (BTM) e concentrado proteico de soro de leite como matérias de parede frente, em um sistema que mimetiza *in vitro* o trato digestório humano.

METODOLOGIA

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

A cultura do *L. acidophilus*, na proporção de 1% (m.v⁻¹), foi adicionada em caldo MRS (De Man Rogosa and Sharpe, Merck, Darmstadt, Alemanha) e foram incubados em estufa incubadora B.O.D (403-3D, Nova Ética, Brasil) a 37 °C ± 1 °C por 9 horas. Após atingir a fase exponencial, o *Lactobacillus acidophilus* foi centrifugado a 3000 rpm por 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi, então, descartado e lavado por duas vezes com solução de água peptonada 0,1%. O microrganismo foi suspenso nas soluções de pectina BTM e CPS, preparados conforme metodologia proposta por Cancino-Castillo *et al.* (2020), onde a pectina BTM e o CPS foram dissolvidos em água destilada esterilizada, seguida de agitação magnética à 37 °C ± 1 °C (752A, Fisatom, São Paulo, Brasil) por 30 minutos, até completa dissolução e hidratação, 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). O processo de microencapsulação foi realizado conforme Nunes *et al.* (2018), com modificações, utilizando-se o equipamento *spray drying*, de escala laboratorial (SDi 1.0, Labmaq do Brasil, São José do Rio Preto, SP, Brasil), onde as suspensões acrescidas do probióticos foram mantidas sob agitação constante à temperatura ambiente 25 °C e alimentadas para a câmara de secagem por meio de bomba peristáltica, 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).

SOBREVIVÊNCIA DE *L. ACIDOPHILUS* LIVRE E MICROENCAPSULADO NOS FLUIDOS GÁSTRICO E INTESTINAL SIMULADOS

A resistência do *L. acidophilus* nas formas livre (grânulos secos) e microencapsulados, em sistemas do fluido gástrico e intestinal simulado (FGIS), foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Bora et al. (2021), com adaptações. As microcápsulas e as células livres foram submetidas aos fluidos digestivos, que foram preparados utilizando soluções estoque de KCl (Cloreto de Potássio), KH₂PO₄ (Fosfato monopotássico), NaHCO₃ (Bicarbonato de sódio), NaCl (Cloreto de sódio), MgCl₂ (Cloreto de magnésio), (NH₄)₂CO₃ (Carbonato de amônio), HCl (Ácido clorídrico) previamente determinados na literatura (MINEKUS et al., 2014; BORA et al., 2021).

Na fase salivar as amostras foram misturadas com o SSF (1:1, m /m) em tubos Falcon 50 mL, e o pH ajustado para 7 usando solução de NaOH (Hidróxido de sódio) 1,0 M, em seguida foi acondicionada em incubadora do tipo Shaker (SL-221, Solab, Piracicaba, Brasil) a 37 °C ± 1 °C sob agitação constante a 85 rpm durante 2 minutos. Em seguida, o SGF (1:1 (v / v) e uma solução de pepsina suína (3,8 mg/mL) foram adicionados a fase oral. A mistura foi ajustada para pH 3 usando uma solução de HCl (1,0 M) e incubada a 37 °C por 2 h com agitação constante a 85 rpm. Em seguida, o quimo gástrico obtido foi misturado com SIF (1:1 v / v), extrato de bile suína (37,8 mg/mL) e pancreatina suína (16,25 mg/mL). O quimo intestinal resultante foi incubado (37 °C, pH 7) por 2 h. Ao final de cada etapa, alíquotas de cada amostra (1 mL) foram diluídas em 9 mL de água peptonada estéril 0,1%, e agitadas em vortex por 30 segundos. A contagem bacteriana foi realizada em placas seguindo a metodologia proposta por Corti, Bittencourt e Drunkler (2017).

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 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* nas condições gastrointestinais simuladas, tanto na forma livre quanto encapsulada nas diferentes concentrações de pectina BTM e de concentrado de proteico de soro de leite, encontram-se descritas na Tabela 2.

Pelos resultados obtidos, é possível verificar que o probiótico na forma livre não sobreviveu a passagem pelo trato digestório. Por sua vez, o microrganismo microencapsulado manteve-se viável durante a passagem pelo trato digestório, onde o T1 resultou em maior viabilidade que o T2 (p<0,05) (Tabela 1). Logo, a microencapsulação foi eficaz para aumentar a viabilidade do probiótico, em especial, quando concentrações maiores de pectina BTM foram utilizadas.



Tabela 2 – Viabilidade de células de *Lactobacillus acidophilus* La3 livres e microencapsuladas (Log UFC g⁻¹) em diferentes concentrações de pectina e concentrado proteico de soro de leite pelo método de spray drying nas condições gastrointestinais simuladas.

Tempo (Min)	pH	Célula livre	T1	T2
0	-	9,75±1,01 ^{aA}	8,03 ± 0,63 ^{aB}	7,90 ± 0,88 ^{aB}
Fase Oral	7,0	6,93±1,18 ^{bA}	6,81± 1,05 ^{abAB}	7,10 ± 0,86 ^{aA}
Gástrica	3,0	5,91±0,03 ^{bA}	6,83 ± 0,88 ^{abA}	5,37 ± 2,75 ^{aA}
Intestinal	7,0	< 10 ⁻²	6,42 ± 1,08 ^{bA}	5,66 ± 2,91 ^{aA}
% de Sobrevivência	-	---	79,96%	71,65%

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).

A literatura enfatiza que para um alimento ser carreador de probiótico e exercer os efeitos benéficos é fundamental que esse alimento contenha, no mínimo, uma quantidade específica de células viáveis, que fica entre 10⁶ a 10⁷ UFC g⁻¹. A viabilidade das células probióticas é crucial, devendo ser mantida durante o processamento, armazenamento e trânsito pelo sistema digestivo (SILVA et al., 2019; MENEZES, 2019).

Este estudo corrobora com pesquisas prévias que demonstraram a eficácia da microencapsulação na proteção de probióticos durante simulações do trato gastrointestinal. Na pesquisa de Gebara *et al.* (2013), também verificaram maior viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La5 microencapsulado utilizando pectina BTM e pectina BTM com soro de leite por meio da gelificação ionotrópica do que a forma livre durante simulações de condições gastrointestinais com pH variando de 1,2 a 3,0 e condições intestinais simuladas com pH 7.

Li et al. (2019) investigaram o efeito da microencapsulação de *Bifidobacterium breve* CICC6182 com pectina BTM por meio da técnica de reticulação iônica sobre a viabilidade durante a exposição simulada em fluídos gastrointestinais. Os resultados revelaram que a redução da viabilidade do microrganismo encapsulado foi de apenas 1,76 log UFC g⁻¹ em comparação com 4,82 log UFC g⁻¹ observados para o probiótico na sua forma livre. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos no presente estudo.

CONCLUSÃO

A microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* por *spray drying* utilizando pectina BTM e concentrado de soro de leite como materiais de parede garantiu a sobrevivência do probiótico quando submetido a simulação da passagem pelo sistema gastrointestinal.



Agradecimentos

Este estudo foi financiado em parte pela CAPES - Brasil, Código de Financiamento 001.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

BARRO, N.P.R. et al. Microencapsulation of Probiotic *Lactobacillus helveticus* with Different Wall Materials by Spray drying. **Biointerface Research in Applied Science**, v.11, n.4, p.11221-11232, 2021.

BORA, A.F.M.; LI, X.; LIU, L. Physicochemical and functional characterization of newly designed biopolymeric-based encapsulates with probiotic culture and charantin. **Foods**, v.10, n.2677, p.1-20, 2021.

BRAND, R. D. Aplicação de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado com diferentes materiais de parede em preparado sólido para refresco. [S. l.: s. n.], **Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos)**. 49p. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, PR. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 241, de 26 de julho de 2018, dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. **Diário Oficial da União. Poder Executivo. Brasília**, DR.2018.

CANCINO-CASTILLO *et al.* Effective microencapsulation of *Enterococcus faecium* in biopolymeric matrices using spray drying. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.104, n.22, p.9595-9605, 2020.

CORTI, D. et al. Use of milk protein and maltodextrin in the microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus*: a model approach. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 39, no. SI, Dec. 2017.

DU, Q. et al. The complex of whey protein and pectin: Interactions, functional properties and applications in food colloidal systems - A review. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v.210, 112253, p.1-13, 2022.

GEBARA, C. et al. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v.51, p.872-878, 2013.



HILL, C. *et al.* Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v.11, n.8, p.506-514, 2014.

LI, M. *et al.* Preparation of *Bifidobacterium breve* encapsulated in low methoxyl pectin beads and its effects on yogurt quality. *Journal of Dairy Science*, v.102, p.1-12, 2019.

MINEKUS, M. *et al.* A standardised static in vitro digestion method suitable for food – An international consensus. **Food & Function**, v.5, p.1113-1124, 2014.

NRIAGU, J.O. Historical Perspectives. In: NRIAGU, J.O. e NIEBOER, E.(Eds.). *Chromium in the Natural and Human Environments, ADVANCES IN ENVIRONMENTAL SCIENCE AND TECHNOLOGY*. **New York : John Wiley**, v.20, 1988, p. 1-19.

NUNES, G.L. *et al.* Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* la-5 and *Bifidobacterium* bb-12 by spray drying and evaluation of its resistance in simulated gastrointestinal conditions, thermal treatments and storage conditions. **Ciência Rural**, v.48, n.6, p.1-11, 2018.

OLIVEIRA, J.L.; ALEMIDA, C.; BOMFIM, N.S.; A importância do uso de probióticos na saúde humana. **Unoesc & Ciência – ACBS**, v.8, n. 1, p. 7-12,2017.

RABÊLO, C.A. *et al.* Quantificação da microbiota presente em produtos lácteos industrializados comercializados como probióticos. **RECIMA21 -revista científica multidisciplinar** issn 2675-6218, p. 1-5.

SILVA, M. N. Desenvolvimento de manteiga funcional adicionada de microrganismos probióticos. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos). 192p. **Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências Rurais**. Santa Maria, RS. 2019.

SOUZA, C. *et al.* Probióticos e a indústria de alimentos: Uma visão geral. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v.1, n.3, p. 1-23, 2020.

TIMILSENA, Y. P.; HAQUE, MD. A.; ADHIKARI, B. Encapsulation in the Food Industry: A Brief Historical Overview to Recent Developments. **Food and Nutrition Sciences**, v. 11, n. 06, p. 481–508, 2020.

VAN EKENSTEIN, G.O.R.A.; DEURING, H.; TEN BRINKE, G.; ELLIS, T.S. Blends of Caprolactam/Caprolactone Copolymers and Chlorinated Polymers. **Polymer**, v. 38, p.3025-3034, 1997.

VIANA, C. C. R.; RENHE, I. R. T.; BESSA, M. E. de; MARTINS, E.; STEPHANI, R.; CARVALHO, A. F. de; PERRONE, Í. T. Microencapsulamento de bactérias probióticas: uma breve revisão. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 10, n. 13, p. e242101320814, 2021.