

INFLUÊNCIA DO PREPARO DO INÓCULO NA SOBREVIVÊNCIA DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS ENCAPSULADAS LIOFILIZADAS

Isabela Maciel Orosco¹; Cynthia Jurkiewicz Kunigk²

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

²Professora Dra. da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT).

Resumo. *O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar a sobrevivência do micro-organismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* submetido ao processo de encapsulação seguido de liofilização. Para tanto, três métodos de preparo do inóculo, foram avaliados: 1) adição direta da cultura comercial liofilizada; 2) ativação da cultura em leite desnatado; 3) cultivo da cultura em caldo MRS e recuperação das células na fase estacionária de crescimento. Após o preparo do inóculo, o micro-organismo foi encapsulado em alginato de sódio pelo método de extrusão e em seguida liofilizado. A encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* na fase estacionária de crescimento aumentou a resistência do micro-organismo ao processo de liofilização. Durante 21 dias de armazenamento à vácuo a 5°C, a contagem de *L. acidophilus* nas cápsulas liofilizadas permaneceu constante, independentemente do método de preparo do inóculo.*

Introdução

O termo probiótico se refere a micro-organismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; Sanders, 2003). Os produtos lácteos contêm proteínas, gorduras, lactose, minerais e vitaminas, sendo considerados nutritivos, e veículos adequados para o desenvolvimento e a sobrevivência de probióticos (Thamer, Penna, 2006). Por outro lado, alimentos com baixo valor nutritivo, reduzida atividade de água (como cereais e queijos duros) e baixo pH (como sucos), apresentam condições desfavoráveis para a sobrevivência dos mesmos. Nesses alimentos, para a incorporação de bactérias probióticas, é necessário utilizar tecnologias que protejam o micro-organismo do meio externo e aumentem sua viabilidade no produto.

A microencapsulação é uma tecnologia que envolve materiais sólidos, líquidos e gasosos em pequenas cápsulas que liberam seu conteúdo sob condições controladas. Essa tecnologia tem sido utilizada com a finalidade de proteger as bactérias probióticas das condições adversas do trato digestivo e também no alimento durante sua vida útil. (Desai, Park, 2005; Champagne, Fustier, 2007). Diversas técnicas de microencapsulação podem ser aplicadas, sendo as mais utilizadas, a emulsão, a extrusão e a atomização.

Para a adição de culturas probióticas em alimentos com baixa atividade de água, é necessário que a cultura passe por um processo de secagem sem que sua viabilidade seja prejudicada. Dentre os métodos de secagem, a liofilização é a tecnologia mais utilizada na preservação de micro-organismos, já que mantém alta a viabilidade das células (Morgan, C. A. *et al.*, 2006).

No mercado nacional de alimentos probióticos existe uma grande carência de novos produtos, como sucos e cereais, já que iogurtes e outros leites fermentados são atualmente os principais alimentos probióticos disponíveis.

De forma a aumentar a viabilidade de micro-organismos probióticos nos alimentos, o presente estudo teve como objetivo avaliar sobrevivência do probiótico *Lactobacillus acidophilus* submetido ao processo de encapsulação seguido de liofilização. A etapa de preparo do inóculo, antes da encapsulação também foi avaliada.

Materiais e Métodos

Micro-organismo

Foi utilizada a cultura liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* NCFM FloraFIT (Danisco) com contagem celular de $1,0 \times 10^{10}$ UFC/g. Esta cultura foi armazenada a -18°C até o momento de utilização.

Preparo do inóculo de *Lactobacillus acidophilus*

Três métodos de preparo do inóculo para a posterior encapsulação e liofilização foram avaliados: 1) adição direta da cultura comercial liofilizada; 2) ativação da cultura em leite desnatado; 3) cultivo da cultura em caldo MRS e recuperação das células na fase estacionária de crescimento.

Para adição direta do micro-organismo em alginato de sódio (método 1) foi adicionado 0,5 g da cultura comercial de *L. acidophilus* à cada 100 mL de uma solução de alginato de sódio VOGLER (I - 3G - 150 - Kimica Chile Ltda.) a 2,0 % em água destilada.

Para a ativação do micro-organismo em leite desnatado (método 2), foi adicionado em 10 mL de leite desnatado (Molico da Nestlé) reconstituído a 10% e esterilizado, 1,0 g da cultura comercial de *L. acidophilus*. A suspensão foi incubada a 37°C por 2 horas e 5,0 mL dessa suspensão foram adicionados a 95 mL da solução de alginato de sódio a 2,0 %.

Para o cultivo do micro-organismo em caldo MRS (método 3), inicialmente foi obtida a curva de crescimento da bactéria em caldo MRS (De Man Rugosa e Sharpe, Oxoid) para determinação do início da fase estacionária de crescimento. Para tanto, foi adicionado 0,5 g da cultura de *L. acidophilus* em 50 mL de solução de água peptonada 0,1% estéril. Essa suspensão foi submetida a diluições decimais seriadas até atingir a concentração de micro-organismos de $1,0 \times 10^3$ ufc·mL⁻¹. A partir dessa suspensão, 1,0 mL foi adicionado em tubos contendo 9 mL de caldo MRS. Os tubos foram incubados em estufa a 37°C e em intervalos de 0, 15, 20 e 24 horas, foi retirado um tubo, para leitura de transmitância e absorbância em espectrofotômetro a 640 nm e para a contagem de *L. acidophilus*. Foram construídas as curvas de crescimento do micro-organismo para determinar o início da fase estacionária.

Após a determinação do tempo para o microrganismo atingir a fase estacionária, que foi correlacionada com a absorbância do meio, foi realizado o cultivo de *L. acidophilus* em caldo MRS para posterior encapsulação e liofilização. Para tanto, foi adicionado 0,5 g da cultura de *L. acidophilus* em um frasco contendo 50 mL de solução de água peptonada 0,1% estéril. Essa suspensão foi submetida a diluições decimais seriadas até obter uma concentração de $1,0 \times 10^4$ UFC·mL⁻¹. Dessa suspensão, foram adicionados 1,5 mL em cada erlenmeyer com 150 mL de caldo MRS esterilizados. Os erlenmeyers foram incubados em estufa a 37°C até o microrganismo atingir a fase estacionária de crescimento, determinada pela medida de absorbância.

A suspensão de microrganismo na fase estacionária de crescimento foi dividida em tubos e centrifugada durante 30 minutos a 5000 rpm. O sedimento foi lavado com solução salina 0,85 % estéril. O procedimento de centrifugação e lavagem foi repetido duas vezes e o sedimento final foi transferido para apenas um tubo e suspenso em 40 mL solução salina 0,85 % estéril. Essa suspensão foi adicionada a 300mL de solução de alginato de sódio a 2,0 %.

Encapsulação

Conforme descrito por Boscarioli (2010), o método utilizado para encapsulação de microrganismos teve como base a técnica de extrusão. A suspensão de microrganismo, preparada de acordo com os diferentes métodos de preparo do inóculo foi adicionada por aspersão a uma solução 0,1M de cloreto de cálcio PA (Vetec) através de um tubo de aço inoxidável (1m de comprimento, diâmetro interno de 12 mm e externo de 16,5 mm) com o bocal acoplado a um bico de equipamento “spray drying” com saída tipo leque (45° , modelo

1/4J da Systens do Brasil) na extremidade. A solução de alginato de sódio contendo o microrganismo foi adicionada ao tubo de aço inoxidável com o auxílio de uma bomba peristáltica na vazão de $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e o ar comprimido numa vazão de $2,5 \text{ m}^3\cdot\text{min}^{-1}$. A solução de cloreto de cálcio permaneceu sob agitação magnética constante até o término da encapsulação.

As cápsulas de alginato de cálcio eram formadas quando a solução de alginato de sódio entrava em contato com a solução de cloreto de cálcio. Ao terminar o processo, as cápsulas permaneceram em repouso por 30 minutos e, logo após, separadas da solução de cloreto de cálcio com o auxílio de peneira de aço inoxidável (Mesh de 250), lavadas com água destilada e filtradas com papel filtro quantitativo (filtragem lenta) nº 1542 de diâmetro igual a 150 mm.

Liofilização

O micro-organismo encapsulado em alginato de cálcio, segundo descrito no item anterior, foi congelado no liofilizador modelo Enterprise I da Terroni Equipamentos Científicos, e logo após foi liofilizado no mesmo equipamento, na pressão de $150 \mu\text{Hg}$, num processo de 12 horas.

Após a liofilização, as cápsulas foram embaladas a vácuo e armazenadas, em geladeira a 5°C .

Contagem do micro-organismo

Uma amostra de 0,5 g do microrganismo encapsulado ou 0,5 g de cápsulas liofilizadas foi homogeneizada em Stomacher com 49,5 mL de solução tampão fosfato pH 7,3. A partir desta diluição foram feitas diluições decimais seriadas em solução salina 0,85% estéril. Alíquotas de 0,1 mL de diluições adequadas foram transferidas para placas de petri contendo agar MRS e espalhadas com alça de drigalski. As placas foram incubadas a 43°C por 72 horas em jarras de anaerobiose, contendo gerador de anaerobiose anaerogem (OXOID). As colônias típicas de *Lactobacillus acidophilus* apresentavam diâmetro de aproximadamente 3mm, coloração branca, leitosa, achatadas e com borda irregular. As contagens foram realizadas em duplicata após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento das cápsulas liofilizadas.

Resultados e Discussão

Curva de crescimento de *Lactobacillus acidophilus* em caldo MRS

As tabelas 1, 2 e 3 apresentam os valores de absorvância, transmitância e contagem de *L. acidophilus* durante o cultivo em caldo MRS, para as três réplicas respectivamente.

As figuras, 1, 2 e 3 apresentam os valores de absorvância em função do tempo de cultivo de *L. acidophilus* em caldo MRS, para as três réplicas respectivamente.

Tabela 1 – Transmitância, absorvância e contagem de *L. acidophilus* durante o cultivo em caldo MRS (Ensaio 1).

Tempo (h)	Absorvância	Transmitância (%)	Contagem ($\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$)
0	0	100,00	$7,2 \times 10^3$
15	0,0113	97,90	$4,2 \times 10^6$
20	0,6899	23,80	$6,2 \times 10^7$
24	1,8206	5,30	$3,4 \times 10^8$
26	1,8624	4,89	$3,7 \times 10^8$

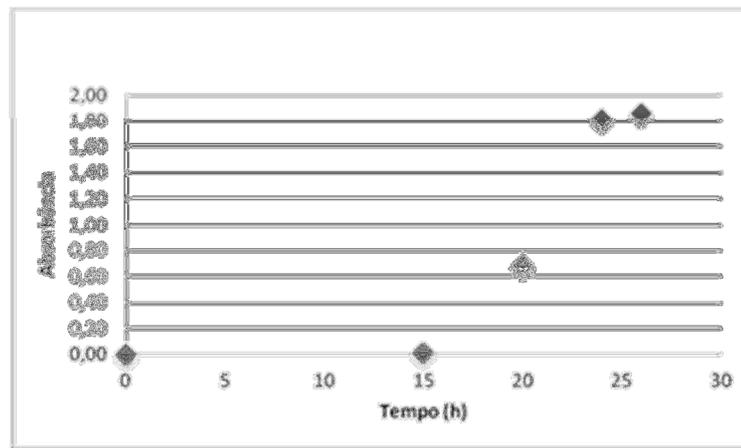


Figura 1 – Absorvância em função do tempo de cultivo de *L. acidophilus* em caldo MRS (Ensaio 1).

Tabela 2 – Transmitância, absorvância e contagem de *L. acidophilus* durante o cultivo em caldo MRS (Ensaio 2).

Tempo (h)	Absorvância	Transmitância (%)	Contagem (UFC·mL ⁻¹)
0	0	100,00	4,3 x 10 ³
15	0,0117	97,50	2,4 x 10 ⁶
20	0,6400	23,10	6,0 x 10 ⁷
24	1,1497	7,20	3,4 x 10 ⁸
26	1,1383	7,12	2,5 x 10 ⁸

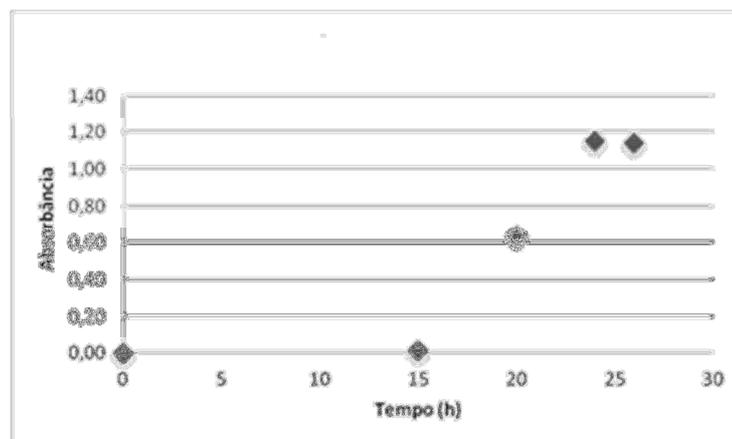


Figura 2 – Absorvância em função do tempo de cultivo de *L. acidophilus* em caldo MRS (Ensaio 2).

Tabela 3 – Transmitância, absorvância e contagem de *L. acidophilus* durante o cultivo em caldo MRS (Ensaio 3).

Tempo (h)	Absorvância	Transmitância (%)	Contagem (UFC·mL ⁻¹)
0	0	100,00	5,4 x 10 ³
15	0,0138	96,80	3,2 x 10 ⁶
20	0,4380	26,40	6,6 x 10 ⁷
24	1,5675	6,50	3,4 x 10 ⁸
26	1,6213	6,18	3,8 x 10 ⁸

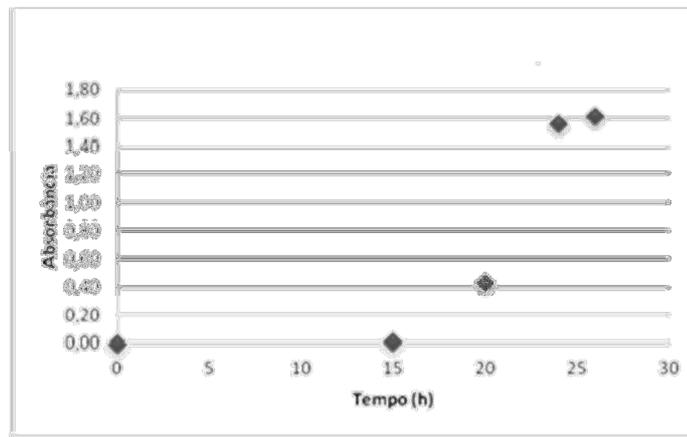


Figura 3 – Absorvância em função do tempo de cultivo de *L. acidophilus* em caldo MRS (Ensaio 3).

De acordo com as curvas de crescimento foi definido que o início da fase estacionária de crescimento de *L. acidophilus* ocorreu em 24 h de cultivo.

A população de *L. acidophilus* em função da absorvância do meio está apresentada na figura 4. Para valores de absorvância acima de 1,2, pode-se considerar que o microrganismo atingiu a fase estacionária de crescimento, com contagens acima de 10^8 UFC/mL.

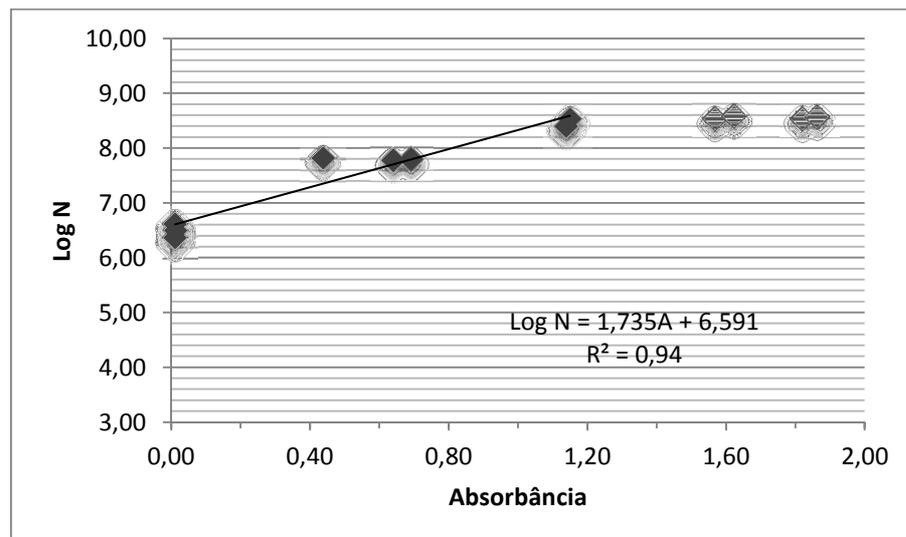


Figura 4 – Contagem de *L. acidophilus* em função da absorvância.

Sobrevivência de *L. acidophilus* em cápsulas de alginato de cálcio

As tabelas 4, 5 e 6 apresentam as contagens de *L. acidophilus* nas cápsulas antes e após a liofilização, para os diferentes métodos de preparo do inóculo.

Tabela 4 – Contagem de *L. acidophilus* nas cápsulas liofilizadas com adição direta da cultura.

Tempo (dias)	Log (UFC·g ⁻¹)			Média ± dp
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	
0*	7,85	7,82	7,74	7,80±0,06
1	6,68	6,61	6,65	6,65±0,03
7	6,62	6,63	6,70	6,65±0,04
14	6,68	6,63	6,66	6,66±0,02
21	6,69	6,54	6,64	6,62±0,08

*População nas cápsulas antes da liofilização

Tabela 5 – Contagem de *L. acidophilus* nas cápsulas liofilizadas com micro-organismo ativado em leite.

Tempo (dias)	Log (ufc·g ⁻¹)			Média ± dp
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	
0*	8,99	8,93	8,95	8,96±0,02
1	7,44	7,46	7,44	7,45±0,01
7	7,38	7,38	7,44	7,40±0,03
14	7,31	7,25	7,54	7,4±0,1
21	7,46	7,40	7,29	7,38±0,09

*População na cápsula antes da liofilização

Tabela 6 – Contagem de *L. acidophilus* nas cápsulas liofilizadas com micro-organismo cultivado em caldo MRS até fase estacionária de crescimento.

Tempo (dias)	Log (UFC·g ⁻¹)		Média ± dp
	Ensaio 1	Ensaio 2	
0*	9,23	9,25	9,24±0,01
1	9,19	9,23	9,21±0,03
7	9,22	9,19	9,21±0,02
14	9,18	9,04	9,1±0,1
21	9,12	9,04	9,08±0,06

*População nas cápsulas antes da liofilização

Observa-se nas tabelas 4, 5 e 6 que antes da liofilização, a maior população de *L. acidophilus* foi obtida nas cápsulas com o microrganismo na fase estacionária de crescimento. Uma diferença de cerca de 1,5 log ufc·g⁻¹ foi obtida em relação às cápsulas produzidas com a adição direta da cultura. A diferença em relação às cápsulas produzidas com o microrganismo ativado em leite foi de apenas 0,3 log UFC·g⁻¹.

Após a liofilização houve uma redução da contagem de *L. acidophilus* de 1,2 log UFC·g⁻¹ e 1,6 log UFC·g⁻¹ nas cápsulas produzidas com adição direta da cultura e ativação em leite, respectivamente (tabelas 4 e 5). Nas cápsulas produzidas com o micro-organismo na fase estacionária, a população de *L. acidophilus* permaneceu constante (tabela 6).

A maior resistência do microrganismo, quando na fase estacionária já foi relatada por vários autores e foi comprovada no presente estudo.

Durante o armazenamento das cápsulas liofilizadas, à vácuo a 5°C, a população de *L. acidophilus* permanece constante durante os 21 dias, independentemente do método de preparo do inóculo.

Considerando que a população de *L. acidophilus* permaneceu em 10⁹ UFC·g⁻¹ nas cápsulas produzidas com as células na fase estacionária, 1,0 g de cápsula liofilizada poderiam ser adicionados em 100 g de alimento para que o mesmo atendesse a legislação brasileira, que estabelece que o alimento probiótico deva conter entre 10⁸ a 10⁹ UFC na porção diária do produto.

Rendimento do processo de encapsulação

As tabelas 7, 8 e 9 apresentam o rendimento do processo de encapsulação, ou seja, a massa de cápsula produzida em relação à massa da solução de alginato utilizada, e o diâmetro médio das cápsulas para cada método de produção do inóculo.

Tabela 7 – Rendimento do processo de encapsulação e diâmetro das cápsulas produzidas com adição direta do micro-organismo.

Massa de alginato de sódio utilizada (g)	Massa de cápsulas produzidas (g)	Rendimento (%)	Diâmetro médio das cápsulas (µm)
302,15	112,35	37,18	67,0
304,30	110,40	36,28	68,4
300,36	102,12	33,99	63,7

Tabela 8 – Rendimento do processo de encapsulação e diâmetro das cápsulas produzidas com micro-organismo ativado em leite.

Massa de alginato de sódio utilizada (g)	Massa de cápsulas produzidas (g)	Rendimento (%)	Diâmetro médio das cápsulas (µm)
306,46	114,18	37,26	64,0
302,65	108,39	35,81	67,9
301,23	103,87	34,47	63,3

Tabela 9 – Rendimento do processo de encapsulação e diâmetro das cápsulas produzidas com micro-organismo na fase estacionária de crescimento.

Massa de alginato de sódio utilizada (g)	Massa de cápsulas produzidas (g)	Rendimento (%)	Diâmetro médio das cápsulas (µm)
302,35	107,34	35,50	67,7
302,97	105,95	34,97	69,1

O rendimento da encapsulação não variou significativamente ($p > 0,05$) para os diferentes métodos de preparo do inóculo. Em média o rendimento do processo de encapsulação foi de $(35 \pm 1)\%$. O diâmetro médio das cápsulas produzidas com adição direta do micro-organismo, ativação em leite e cultivo prévio em caldo MRS foi respectivamente, 66, 65 e 68 µm, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre os métodos utilizados para o preparo do inóculo.

Rendimento da liofilização

As tabelas 10, 11 e 12 apresentam o rendimento da liofilização, ou seja, a massa inicial de material a ser liofilizado em relação à massa de material liofilizado.

Tabela 10 – Rendimento da liofilização com adição direta do micro-organismo.

Massa de cápsulas antes da liofilização (g)	Massa de cápsulas após liofilização (g)	Massa de água perdida (g)	Rendimento (%)
111,29	4,33	106,96	3,89
109,31	4,12	105,19	3,77
101,04	3,89	97,15	3,85

Tabela 11 – Rendimento da liofilização com micro-organismo adicionado pelo método de ativação em leite.

Massa de cápsulas antes da liofilização (g)	Massa de cápsulas após liofilização (g)	Massa de água perdida (g)	Rendimento (%)
113,07	4,41	108,66	3,90
107,29	3,97	103,32	3,70
102,78	3,90	98,88	3,79

Tabela 12 – Rendimento da liofilização com micro-organismo ativado em caldo MRS até fase estacionária de crescimento.

Massa de cápsulas antes da liofilização (g)	Massa de cápsulas após liofilização (g)	Massa de água perdida (g)	Rendimento (%)
106,22	4,12	102,10	3,88
104,86	3,96	100,90	3,78

O rendimento da liofilização não variou significativamente ($p > 0,05$) para os diferentes métodos de preparo do inóculo. A média do rendimento da liofilização foi de $(3,82 \pm 0,07)\%$.

Considerando a variação da massa de cápsulas após a liofilização, que foi de 96,18 %, a redução da contagem da bactéria após o processo, foi aproximadamente, 3,2, 3,6 e 2,2 Log UFC, nas cápsulas produzidas com adição direta da cultura, ativada em leite, e com o micro-organismo na fase estacionária de crescimento, respectivamente.

Conclusões

A encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* na fase estacionária de crescimento aumentou a resistência do micro-organismo ao processo de liofilização.

A contagem de *L. acidophilus* permaneceu constante nas cápsulas encapsuladas e liofilizadas, durante 21 dias de armazenamento à vácuo a 5°C.

Referências Bibliográficas

- Boscarioli, M.P.M. (2010) Influência de prebióticos na encapsulação de bactérias probióticas adicionadas em sorvete. Dissertação de Mestrado da Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia.
- Champagne, C.P.; Fustier, P. (2007) Microencapsulation for the improvement delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion Biotechnology*, **18**, 184-190.
- Desai, K.G.H.; Park, H.J. (2005) Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying technology*, **23**, 1361-1394.
- FAO/WHO. (2001) Evaluation of health and nutritional properties of powder Milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, FAO/ WHO Expert Consultation.
- Franco, B.D.G. M; Landgraf, M. (2008) *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte, Atheneu,
- Morgan, C.A.; Herman, N.; White, P.A.; Vese, G. (2006) Preservation of micro-organisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods*, **66**, 183-193.
- SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. (2003) *Nutrition Review*, **61**, 91-99.
- Thamer, K.G.; Penna, A.L.B. (2005) Efeito do teor de soro, açúcar e frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **41**, 393-400.