

APLICAÇÃO DE PROBIÓTICOS ENCAPSULADOS EM BARRA DE FRUTA

Letícia Hana Matuzaki ¹; Cynthia Jurkiewicz Kunigk ²

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

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

Resumo. *Atualmente a busca por alimentos vai além do sabor, os consumidores procuram também benefícios ao se alimentar, ou seja, alimentos com características funcionais. Neste cenário, o desenvolvimento de uma barra de fruta probiótica atende a esta demanda, uma vez que une o benefício do consumo da fruta à funcionalidade dos microrganismos probióticos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a sobrevivência de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* livre e microencapsulado, adicionado à uma matriz de ameixa (base para a produção de uma barra de ameixa), com diferentes valores de atividade de água (*aw*), durante 28 dias de armazenamento. O microrganismo mostrou-se menos resistente na matriz de ameixa com atividade de água 0,795 e maior resistência no produto com *aw* de 0,585. A microencapsulação aumentou em 2,5 logs a sobrevivência da bactéria na matriz de ameixa com atividade de água de 0,795, após 21 dias de armazenamento à 5 °C.*

Introdução

As frutas na forma de snacks, em barras, atendem aos requisitos de conveniência e praticidade, saudabilidade e bem-estar, e ainda sensorialidade e prazer, exigidos atualmente pelo consumidor (Brasil Food Trends 2020, 2010).

Entre as frutas, é conhecido que ameixas secas apresentam efeito laxativo. Segundo Stacewicz-Sapuntzakis et al. (2001), esse efeito pode ser explicado pela presença de fibras, grandes quantidades de sorbitol e possíveis compostos fenólicos.

Alimentos probióticos fazem parte do grupo de alimentos funcionais. Nesses produtos, microrganismos probióticos são adicionados de forma a conferir benefícios à saúde quando ingeridos em quantidades adequadas (Hill et al., 2014).

A aplicação de culturas probióticas em produtos não lácteos representa uma mudança significativa no mercado, entretanto a viabilidade dos microrganismos será função de vários fatores, tais como, pH, atividade de água, temperatura da estocagem, e disponibilidade de oxigênio (Oliveira, 2002).

As barras de frutas possuem baixo pH e baixa atividade de água, condições desfavoráveis à sobrevivência de probióticos. Alterações nesses parâmetros podem influenciar de forma decisiva a sobrevivência das bactérias e a viabilidade técnica do desenvolvimento de produtos com tais características. A estabilidade do microrganismo probiótico no alimento e sua capacidade de sobreviver à passagem pelo trato digestório e atingir o cólon em número elevado, são os principais desafios enfrentados pela indústria. Uma maior resistência dos probióticos aos ambientes adversos pode ser obtida com o processo de microencapsulação, ou seja, os probióticos são incorporados em uma matriz polimérica ou membrana de revestimento que protege as células dos microrganismos (Anal & Singh, 2007).

Dessa forma, estudos que correlacionem a viabilidade do probiótico, livre e encapsulado, com fatores intrínsecos do alimento são fundamentais para que novos produtos sejam desenvolvidos (Desai e Park 2005).

De forma contribuir para o desenvolvimento de produtos probióticos não lácteos, o presente trabalho teve como objetivo o estudo da sobrevivência do probiótico *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* adicionado em matriz de ameixa com diferentes valores de atividade de água, assim como avaliar a influência da microencapsulação na viabilidade do microrganismo.

Material e Métodos

Preparo das matrizes de ameixa

As matrizes de ameixa, base para a produção das barras de fruta, foram preparadas segundo as formulações apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Formulações das matrizes de ameixa

| Ingrediente (%) | Formulação | | |
|-------------------|------------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 e 4 |
| Sacarose | 34,95 | 20,00 | 4,95 |
| Xarope de glicose | 4,95 | 4,95 | 4,95 |
| Ameixa | 59,00 | 59,00 | 59,00 |
| Água | 0,00 | 14,95 | 30,00 |
| Cloreto de cálcio | 0,10 | 0,10 | 0,10 |
| Pectina BTM | 1,00 | 1,00 | 1,00 |

Para a produção das matrizes de fruta, a ameixa seca foi adicionada ao equipamento Thermomix (VORWERK) juntamente com 50% da água e 25% da massa total de sacarose (UNIÃO) e a mistura foi homogeneizada por 5 minutos a 37°C. Em seguida, o xarope de glicose (Karo), a pectina (Dupont – LC 950) e o restante da sacarose e água foram adicionados, e homogeneizados na velocidade 4 a 70°C por 2 minutos. Por fim, foi adicionado o cloreto de cálcio e a massa foi homogeneizada. A mistura permaneceu em aquecimento a 70°C e a cada 10 minutos foi retirada uma amostra para determinação de sólidos solúveis (Brix) em refratômetro (Biobrix) e da atividade de água (Acqualab). O pH da massa de ameixa foi determinado em potenciômetro (Metler), sendo este 3,86 para todas as matrizes.

Para as formulações 3 e 4 a variante durante o processo foi o tempo de aquecimento, sendo ele menor para a formulação 4.

Preparo da cultura probiótica

Uma massa de 0,1 g da cultura liofilizada de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Chr. Hansen) foi homogeneizada (STOMACHER, Seward) a 260 rpm por 2 minutos com 100 mL de solução salina estéril 0,85%. Uma alíquota de 0,1mL dessa suspensão foi adicionada em 100 mL de caldo MRS (Oxoid) com 5% de solução de cisteína a 10%, e incubada à 37°C durante 20 horas. O caldo foi centrifugado (Mega 21R, Hanel) a 6000 rpm em temperatura de 4°C por 15 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram lavadas com solução salina 0,85% estéril e centrifugadas nas mesmas condições anteriores. O *pellet* obtido foi suspenso em 4,2 mL de solução salina 0,85%, e a suspensão utilizada para a encapsulação ou incorporação direta na matriz de fruta.

Microencapsulação

A técnica de encapsulação utilizada foi a de extrusão conforme descrita por Boscarioli (2010) com modificações. A solução encapsulante de alginato de sódio 1,0 % contendo 3,0% da suspensão de bactéria probiótica foi aspergida, através de um bico aspersor (1,5 mm de diâmetro de abertura), em uma solução de cloreto de cálcio 0,1 M na qual as cápsulas eram formadas. As cápsulas permaneceram 30 minutos na solução antes de serem separadas por filtração com duas peneiras de aço inox de diferentes aberturas de malha, 710 e 250 µm. A lavagem foi feita com solução salina 0,85% estéril e as cápsulas retidas na peneira com abertura de 250 µm foram adicionadas à barra de ameixa.

Adição do microrganismo à matriz de fruta

A adição do microrganismo à matriz de fruta foi feita com as células livres e encapsuladas. Para a adição das células livres, 1 mL da suspensão do microrganismo, obtida após a centrifugação do cultivo em caldo MRS, foi adicionado em 100 g de cada matriz de ameixa. A massa foi homogeneizada manualmente e distribuída em recipientes de polipropileno de 50 mL que foram embalados à vácuo e armazenados à 5°C.

Para a adição das células encapsuladas, para cada 18 g da matriz de ameixa com atividade de água de 0,795 (Formulação 3) foram adicionados 2 g de cápsulas. A mistura foi homogeneizada com auxílio de espátula esterilizada, embalada em recipientes de polipropileno de 50 mL à vácuo e armazenada à 5°C.

Análise microbiológica

A análise microbiológica foi realizada segundo Lima KGC, Kruger MF, Behrens J, Destro MT, Landgraf M, Franco BDGM. Amostras de 10 g da matriz de ameixa com o probiótico livre foram diluídas em 90 mL de solução salina 0,85% estéril e homogeneizadas em STOMACHER a 260 rpm por 5 minutos. A matriz de ameixa com probiótico encapsulado foi diluída em tampão fosfato (pH 7,3) e homogeneizada em STOMACHER a 260 rpm por 10 minutos. A partir destas suspensões, diluições decimais seriadas foram realizadas e alíquotas de 1 mL foram inoculadas em ágar MRS contendo 5% de solução de cisteína a 10% e as placas incubadas em anaerobiose (AnaeroGen – Oxoid) à 37,0 °C por 72 horas.

Determinação do tempo de redução decimal k

O tempo de redução decimal do número de *Bifidobacterium* nas matrizes de ameixa com diferentes valores de atividade de água foram obtidos a partir da equação linear que correlaciona o número de bactérias sobreviventes com o tempo de armazenamento (Equação 1).

$$\log \frac{N}{N_0} = -\frac{t}{k} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

N: número de bactérias em determinado tempo de armazenamento da matriz de ameixa

No: número de bactérias no início do armazenamento da matriz de ameixa

t: tempo de armazenamento (dias)

k: tempo de redução decimal (dias)

Resultados e Discussão

Teor de sólidos solúveis e atividade de água das matrizes de ameixa

Os valores finais da porcentagem de sólidos solúveis para as matrizes com diferentes valores de atividade de água estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de sólidos solúveis e Aw das matrizes de ameixa

| Formulação | Aw | Brix |
|------------|---------------|------|
| 1 | 0,585 ± 0,003 | 82,8 |
| 2 | 0,674 ± 0,006 | 75,7 |
| 3 | 0,795 ± 0,005 | 65,5 |
| 4 | 0,887 ± 0,002 | 53,4 |

Os resultados das contagens de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, adicionado livre nas matrizes de ameixa com diferentes valores de atividade de água, durante os 28 dias de armazenamento podem ser observados na Figura 1.

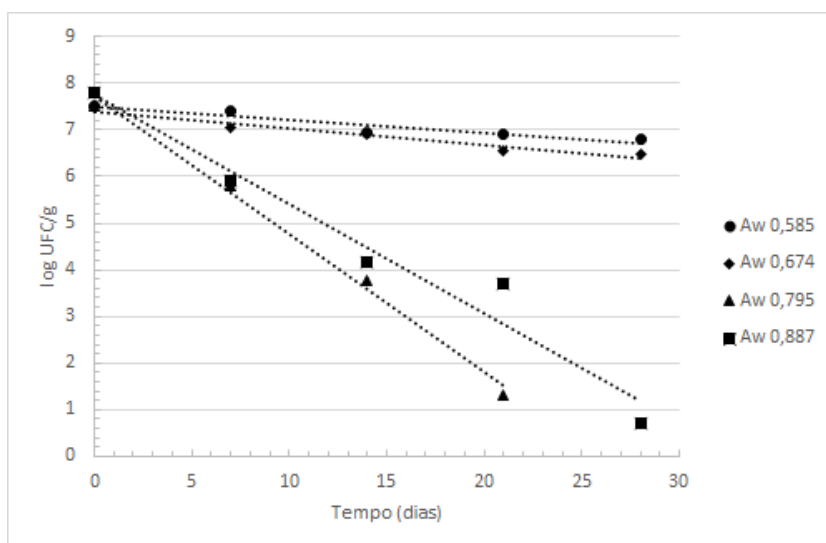


Figura 1- Contagem de *Bifidobacterium animalis* na matriz de ameixa durante o armazenamento a vácuo à 5 °C

Para valores de atividade de água 0,795 e 0,887, é possível observar um decaimento da contagem de *B. animalis* maior quando comparado à redução para valores de atividade de água igual a 0,585 e 0,674. Este fato pode ser constatado na Tabela 3, que mostra o tempo de redução decimal, e o coeficiente de determinação para os ajustes lineares, para cada formulação.

Tabela 3- Parâmetros do modelo para diferentes valores de atividade de água

| Formulação | k (dias) | R ² |
|------------|----------|----------------|
| 1 | 35,7 | 0,905 |
| 2 | 27,8 | 0,952 |
| 3 | 3,4 | 0,993 |
| 4 | 4,4 | 0,959 |

Verifica-se na Tabela 3 que os ajustes obtidos para os modelos foram adequados, com coeficiente de determinação variando entre 0,905 e 0,993. Observa-se também que o tempo de redução decimal na matriz de ameixa com atividade de água de 0,795 (formulação 3) e 0,887 (formulação 4) foi 10,5 e 8,1 vezes menor, respectivamente, quando comparado com o produto com atividade de água de 0,585. Na matriz com atividade de água de 0,795, no 28º dia de armazenamento, não foi mais possível detectar a presença do probiótico, e no produto com atividade de água 0,887 a contagem final foi de 10 UFC.g⁻¹.

Com base nos dados apresentados na Tabela 3, pode-se estimar que as matrizes de fruta com atividade de água 0,585 e 0,674 apresentariam contagem elevada mesmo após 28 dias, uma vez que para a redução de 90 % da população ou 1 ciclo log, seriam necessários 35,7 e 27,8 dias respectivamente.

Segundo Isolauri (2001), um produto probiótico deve apresentar contagem maior ou igual a 1·10⁶ células viáveis·g⁻¹ ou mL do produto, logo as matrizes de ameixa com atividade de água 0,795 e 0,887 seriam consideradas probióticas apenas durante 7 dias de armazenamento à 5 °C. Por outro lado, as matrizes de ameixa com atividade de água 0,585 e 0,674, atenderam ao critério recomendado pelos 28 dias de armazenamento.

Com o intuito de avaliar o efeito da encapsulação, o microorganismo microencapsulado em alginato de cálcio foi adicionado na matriz de fruta com atividade de água 0,795, condição mais

desfavorável para a sobrevivência da bactéria. Como controle, a viabilidade de *B. animalis* livre na mesma matriz também foi avaliada, e os resultados estão apresentados na Figura 2.

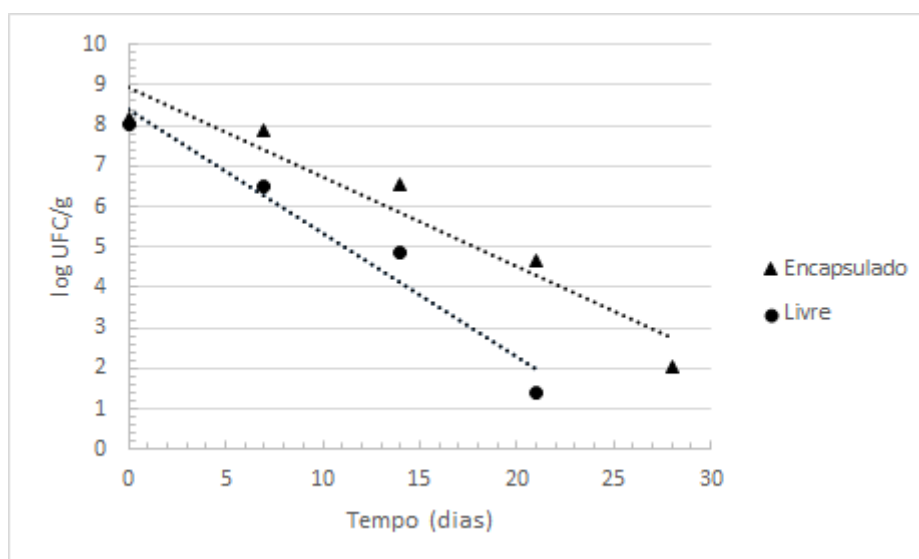


Figura 2 - Contagem de *Bifidobacterium animalis* livre e encapsulado em matriz com a_w 0,795 durante armazenamento a vácuo a 5 °C

É possível notar que o microrganismo encapsulado apresentou menor velocidade de morte (Tabela 4), quando comparado ao microrganismo livre. A encapsulação aumentou o tempo de redução decimal de *B. animalis* na matriz de ameixa em cerca de 36 %. Entretanto, após 28 dias de armazenamento, a contagem da bactéria microencapsulada na matriz de fruta atingiu valores muito reduzidos, cerca de 100 UFC.g⁻¹.

| Microrganismo | k (dias) | R ² |
|------------------|----------|----------------|
| Livre | 3,3 | 0,956 |
| Microencapsulado | 4,5 | 0,925 |

Os resultados mostraram que a atividade de água de uma matriz de ameixa influencia de forma decisiva a sobrevivência do probiótico. A menor viabilidade da bactéria ocorreu no produto com a_w com valor próximo a 0,8, e a maior sobrevivência, no produto com a_w próxima de 0,6. Embora a microencapsulação tenha aumentado a sobrevivência do microrganismo, a contagem na matriz de ameixa com atividade de água de 0,795 não permaneceu em um número suficiente para o produto ser considerado probiótico após 15 dias de armazenamento.

Antunes et al. (2013) avaliaram a viabilidade do desenvolvimento de néctar de acerola probiótico, adicionando *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* BB-12, utilizando as células livres e microencapsuladas por spray dryer com agente encapsulante, ftalato de acetato de celulose. O probiótico adicionado microencapsulado, apresentou uma diminuição de viabilidade menor que 0,5 log UFC·mL⁻¹ em 30 dias de armazenamento sob refrigeração, enquanto a forma livre, apresentou redução de viabilidade de 0,5 log UFC·mL⁻¹ nos primeiros 5 dias de armazenamento. No presente estudo o aumento da viabilidade da bactéria microencapsulada foi bem menor que o observado por Antunes et al. (2013), indicando que novos estudos devem ser condizidos com outros materiais encapsulantes.

Conclusões

A atividade de água mostrou-se como fator de grande influência na sobrevivência de *Bifidobacterium animalis* Bb-12 em matriz de ameixa.

Formulações das matrizes de ameixa com atividade de água de 0,59 e 0,67 mostraram ser adequadas para o desenvolvimento de novos alimentos probióticos.

A encapsulação mostrou ser uma tecnologia com potencial para aumentar a sobrevivência de probiótico em produtos à base de frutas com atividade de água com valor próximo a 0,8.

Referências Bibliográficas

- Anal, A.K.; H. Singh *Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery* Trends Food Science Technology, 18 (2007), pp. 240-251
- Antunes, A., Liserre, A., Coelho, A., Menezes, C., Moreno, I., Yotsuyanagi, K., & Azambuja, N. (2013). *Acerola nectar with added microencapsulated probiotic*. Elsevier.
- BRASIL FOOD TRENDS 2020. Federação das Indústrias do Estado de São Paulo, Instituto de Tecnologia de Alimentos - São Paulo: FIESP/ITAL, 2010. 173p.
- Boscarioli, M., 2010. *Influência de prebióticos na encapsulação de bactérias Probióticas adicionadas em sorvete*. S.l.:exame de qualificação de mestrado da Escola de engenharia mauá do centro universitário do instituto mauá de tecnologia.
- Desai, K. G. H.; Park, H. J. *Recent developments in microencapsulation of food ingredients*. *Drying Technology*, London, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E. *Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic* (2014) *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11 (8), pp. 506-514.
- Isolauri, E. et al. *Probiotics: effects on immunity*. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Houston, USA, v. 73, n. 3, p. 444-450, 2001.
- Lima KGC, Kruger MF, Behrens J, Destro MT, Landgraf M, Franco BDGM. *Evaluation of culture media for enumeration of Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei and Bifidobacterium animalis in the presence of Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus and Streptococcus thermophilus*. *LWT – Food Sci Technol*. 2009;42:491–495
- Oliveira, M. N. de et al. *Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos*. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo , v. 38, n. 1, p. 1-21, Mar. 2002. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322002000100002&lng=en&nrm=iso>. access on 26 Aug. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322002000100002>.
- Stacewicz-Sapuntzakis, M., Bowen, P., Hussain, E., Damayanti-Wood, B., & Farnsworth, N. (June de 2001). *Chemical Composition and Potential Health Effects of Prunes: A Functional Food?*