

AValiação DO EFEITO DA SECAGEM NA VIABILIDADE DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS MICROENCAPSULADOS EM ALGINATO

EVALUATION OF THE EFFECT OF DRYING IN FEASIBILITY MICROORGANISMS PROBIOTICS MICROENCAPSULATED IN ALGINATE

LAURA ADRIANE DE MORAES PINTO^{1*}, GUSTAVO AFFONSO PISANO MATEUS², FERNANDA DE OLIVEIRA TAVARES³, ALINE TAKAOKA ALVES BAPTISTA⁴, ALCEU KAZUO HIRATA⁵, MARIANA OLIVEIRA SILVA⁶, RAQUEL GUTIERRES GOMES⁷, RITA DE CÁSSIA BERGAMASCO⁸

1. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos - Universidade Estadual de Maringá; 2. Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Ambiental - Universidade Estadual de Maringá; 3. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - Universidade Estadual de Maringá; 4. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos - Universidade Estadual de Maringá; 5. Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia - Universidade Estadual de Maringá; 6. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - Universidade Estadual de Maringá; 7. Professora do Departamento de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Maringá; 8. Professora do Departamento de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Maringá.

* UEM – Universidade Estadual de Maringá – Avenida Colombo, 5790, Jardim Universitário, Maringá, Paraná, Brasil. CEP 87020-90. lauraampinto@gmail.com

Recebido em 22/05/2015. Aceito para publicação em 26/06/2015

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes condições de secagem na viabilidade de microrganismos probióticos encapsulados em alginato de cálcio, para posterior adição em alimento pet. A encapsulação da cultura probiótica de *Enterococcus faecium* foi realizada por meio da técnica de extrusão, utilizando alginato de sódio como agente encapsulante. O material microencapsulado foi analisado quanto a umidade residual, contagem de probióticos inicial e final do processo de secagem e rendimento de encapsulação. A contagem de microrganismos ao final de 7 dias de armazenamento foi satisfatória, com um valor de 7,59 log UFC/g porém, após 14 dias de armazenamento a viabilidade das células apresentou uma diminuição. A microencapsulação apresentou bons resultados de rendimento, atingindo 68,27%, demonstrando que tanto a técnica de extrusão como o processo de secagem, mesmo não sendo os mais recomendados, foram satisfatórios.

PALAVRAS-CHAVE: Microencapsulação, extrusão, alginato de sódio, *Enterococcus faecium*.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate different drying conditions and the feasibility of the process of microencapsulation of probiotic micro-organisms encapsulated in calcium alginate for later addition to pet food. The encapsulation of probiotic culture *Enterococcus faecium* was given by the extrusion technique using alginate as the encapsulating agent. The microen-

capsulated material was analyzed by residual moisture, count probiotics initial and final of the drying process and performance. The count after 7 days of storage was satisfactory, reaching 7.59 log CFU / g, however when it got at 14 days cell viability decreased by almost two logarithmic cycle. The results even not reaching levels required by legislation for the characterization of probiotic has proved satisfactory since the yield obtained for values ranging from 25.3 to 67.9%, thus showing that the extrusion process so as drying while not the most recommended were satisfactory.

KEYWORDS: Microencapsulation, extrusion, sodium alginate, *Enterococcus faecium*.

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia de microencapsulação consiste na aplicação de finas coberturas poliméricas a materiais, estes podendo ser sólidos, gasosos e líquidos na forma de gotículas. Após o encapsulamento o material recebe o nome de microcápsula, esta além de realizar a proteção do material encapsulado pode também liberar seu conteúdo sob velocidade e condições específicas¹.

A microencapsulação é uma das técnicas mais promissoras para a proteção de células bacterianas. O encapsulamento atua como agente protetor dos microrganismos probióticos das condições ambientais adversas².

A escolha do processo de microencapsulação é feita com base nas propriedades físicas e químicas tanto do

material a ser encapsulado como do material encapsulante, além da finalidade e uso. Bons encapsulantes devem atender aos seguintes requisitos: não reatividade com o material a ser encapsulado, habilidade de dispersar, emulsificar, capacidade de promover máxima proteção ao material a ser encapsulado contra os agentes externos, ser economicamente viável³.

A secagem além de reduzir o tamanho da microcápsula, tem por finalidade melhorar as suas propriedades de armazenamento. Contudo um ponto importante do processo de secagem é uma técnica utilizada, uma vez que as condições empregadas nesse processo podem ser agressivas aos microrganismos⁴.

A utilização do alginato como um agente encapsulante tem como vantagens sua não-toxicidade, a formação de matrizes suaves com cloreto de cálcio, para interceptar materiais sensíveis, tais como as células microbianas, baixo custo e, por ser um aditivo alimentar, tem sua utilização liberada para o uso em alimentos. O revestimento de alginato protege as bactérias probióticas melhorando sua estabilidade e aumentando a viabilidade dos microrganismos encapsulados⁵.

Várias técnicas de microencapsulação têm sido empregadas a fim de prolongar a sobrevivência dos microrganismos. A microencapsulação por extrusão é o método bastante utilizado para a proteção dos microrganismos devido sua facilidade, simplicidade e baixo custo, além de propiciar sua sobrevivência e viabilidade⁶. A microencapsulação de probióticos é uma alternativa para redução da morte celular, uma vez que esta torna os microrganismos mais resistentes ao processo de digestão, reduz a contaminação e aumenta sua viabilidade⁷.

Algumas bactérias do gênero *Enterococcus*, tais como o *E. faecium* e o *E. faecalis* vem sendo usadas como probióticos em alguns países⁸. De acordo com a legislação vigente no Brasil, para um produto ser considerado probiótico ele deve conter entre 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para consumo diário, sendo que, para quantidades menores a aceitação depende da comprovação da eficiência pelo fabricante⁹.

Atualmente sugere-se para a alimentação animal a ingestão de 10^{10} UFC/dia para cães e 10^8 UFC/dia para gatos. No entanto hoje encontram-se disponíveis no mercado seringas contendo mix de microrganismos probióticos com concentrações variando de 10^5 e 10^7 UFC/dia¹⁰.

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Produtos para Animais de Estimação, o Brasil possui cerca de 37,1 milhões de cães e 21,3 milhões de gatos (população estimada). No ano de 2012 o setor pet brasileiro cresceu 16,4 % e faturou R\$ 14,2 bilhões, colocando o Brasil como o segundo lugar no mercado mundial, atrás apenas dos EUA, com 8% de participação¹¹. Tornando o seguimento pet um mercado atrativo e de potencial investidor.

Para atender esse mercado em crescente expansão os fabricantes de produtos pet visam evoluir, buscando novos produtos para atender esse consumidor cada vez mais exigente e antenado com a tecnologia, sempre à procura de melhorar a qualidade de vida dos seus animais.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a influência de diferentes condições de secagem na viabilidade de microrganismos probióticos microencapsulados em alginato de sódio, para posterior aplicação em alimento pet.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Materiais

Os materiais utilizados para a realização do presente estudo foram: cultura de *Enterococcus faecium*; Alginato de sódio (FMC Biopolymer); Cloreto de cálcio (NUCLEAR); Seringa descartável de 10 mL (BD plastipak); Agulha 0,70x25mm (BD PrecisionGlide).

Métodos

Recuperação dos microrganismos

As cepas estoque de *Enterococcus faecium* sob refrigeração a 10°C em ágar nutritivo foram inoculadas em 50 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubadas a 37°C por 24h. Após o período de incubação o caldo foi centrifugado a 8000 rpm por 5 minutos a 25°C. O *pellet* formado foi posteriormente adicionado a solução de alginato de sódio para posterior microencapsulação.

Microencapsulação

O método utilizado para a microencapsulação do probiótico seguiu a metodologia proposta por Mc Master et al. (2005)¹², com adaptações. Após a recuperação e centrifugação dos microrganismos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi retirado e adicionado à solução de alginato de sódio estéril (1%). Com o auxílio de uma seringa estéril, a solução foi extrusada manualmente em solução de cloreto de cálcio (0,1 M) estéril, sob agitação. As microesferas formadas foram lavadas e separadas por meio de filtração asséptica com água destilada estéril. As microcápsulas obtidas foram acondicionadas em placas de Petri e levadas para secagem em estufa, sob diferentes temperaturas e tempos.

As microesferas foram analisadas quanto a sua contagem de microrganismos probióticos inicial e após 7 e 14 dias da secagem.

Secagem

A secagem das microcápsulas foi realizada em estufa incubadora para BOD modelo 347F, variando tempo e temperatura de secagem, conforme expresso na Tabela 1.

Tabela 1. Tempo e temperatura de secagem das microcápsulas.

Temperatura (°C)	Tempo de Secagem (horas)
30	24
	48
40	24
	48

Contagem dos microrganismos

A avaliação da viabilidade dos microrganismos nas microcápsulas foi realizada a partir de diluições seriadas decimais, onde 0,1g da amostra foi transferida de forma asséptica para um erlenmeyer estéril contendo 9,9 mL de água peptonada (0,1 %). A solução foi agitada vigorosamente e em seguida, foram feitas as diluições de 1mLsubsequentes utilizando-se o mesmo diluente. As inoculações foram realizadas por superfície em meio Ágar BHI na forma de meio de cultura e incubadas à 37°C por 24 horas. As contagens foram realizadas inicialmente ao processo de microencapsulação, com 7 e 14 dias de armazenamento após o processo de secagem. Os resultados das contagens foram expressos em UFC/g.

Umidade residual

O teor de umidade das amostras foi determinado em duplicata, por meio da diferença dos pesos inicial e após secagem das microcápsulas.

Rendimento de Processo

Para se avaliar a eficiência de processo foram utilizadas a contagem dos micro-organismos viáveis nas microcápsulas secas em log UFC/g e o número de micro-organismos existentes na cultura estoque log UFC/g.

$$EYp \% = \frac{\text{Número de m.o nas microcápsulas secas}}{\text{Número de m.o da cultura estoque}} \times 100$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da população de *Enterococcus faecium* antes da secagem em estufa incubadora e após 7 e 14 dias de armazenamento estão apresentados na tabela 1.

Tabela 2. Contagem de células viáveis antes e após secagem, nos dias 7 e 14 de armazenamento e umidade residual.

Temperatura (°C)	30		40	
Tempo de secagem (h)	24	48	24	48
Dias de armazenamento				
Inicial	10,78	10,78	11,32	11,32
7	7,36	5,90	5,91	5,49
14	6,11	4,23	3,80	3,98
Umidade %	1,29	1,42	1,39	1,23

*Os valores apresentados para tempo de secagem encontram-se expressos em log UFC/g e umidade em porcentagem de base seca.

Pode-se observar pela Tabela 1 que a população inicial reduziu significativamente, após 14 dias de estocagem. Para todas as temperaturas avaliadas, houve uma queda na viabilidade do micro-organismos de 0,6 a 2,11 ciclos logaritmos.

Rosa (2010)⁷ cita em seu trabalho que uma das limitações para o uso de alginato como agente encapsulante é a sua alta porosidade. A interação com o ambiente propicia a difusão de água e outros líquidos para dentro da célula, alterando o alginato e expondo o material encapsulado a condições desfavoráveis. A porosidade do gel está diretamente ligada a capacidade de manter a célula e na difusividade com o meio. Apesar de muito baixos, os valores obtidos para a umidade são satisfatórios, e estão relacionados ao período de secagem no qual as amostras foram submetidas. A exposição das microcápsulas ao calor por longos períodos reduziu consideravelmente o teor de água presente na amostra. Além de baixos teores de umidade para as cápsulas secas, outro fator importante é a redução no volume após secagem. Estes pontos são esperados e fundamentais para a qualidade do produto final, pois altas umidades podem propiciar a proliferação de fungos e perda das células imobilizadas.

Chávarri e colaboradores (2005)¹³ relataram que o processo de secagem afeta diretamente a sobrevivência das bactérias, podendo resultar em sua completa inativação, uma vez que microrganismos probióticos são sensíveis aos processos de secagem devido à deterioração do estado fisiológico de suas células.

Boscarioli (2010)¹⁴, em seu trabalho sobre a influência de prebióticos na encapsulação de bactérias probióticas, relatou problemas quanto a secagem em estufa com circulação forçada de ar a 55°C, onde esta se mostrou ineficiente uma vez que reduziu em aproximadamente dois ciclos logarítmicos a população de *L. acidophilus*. Para o autor essa ineficiência foi decorrente das temperaturas aplicadas no processo de secagem, que levaram a um aumento de temperatura na superfície das cápsulas e morte dos micro-organismos. Fato semelhante foi observado neste trabalho, todas as temperaturas diminuíram de 4 a 5 ciclos logarítmicos na contagem de *Enterococcus faecium* após o processo de secagem. Tal fato pode ser atribuído a sensibilidade dos micro-organismos probióticos ao aumento da temperatura e ao tempo de secagem. O que ficou evidente na secagem à temperatura de 30°C, onde o aumento de 24h foi responsável pela diminuição de quase 1,5 ciclos logarítmicos na sobrevivência das células após secagem.

O ciclo logarítmico diminuiu igualmente a temperatura de 30°C, porém sua viabilidade celular foi maior ao final das 36 horas de secagem, este fato pode ser atribuído a proximidade da temperatura a faixa ótima de desenvolvimento do micro-organismo. O prolongado tempo de secagem juntamente com a alta temperatura fizeram a temperatura de 40°C não ser recomendada, uma

vez que esta apresentou os menores índices de viabilidade celular ao final do processo de secagem. Os rendimentos de secagem e de processo são apresentados na tabela 2.

Tabela 3. Rendimentos de secagem de processo da microencapsulação de *Enterococcus faecium* em alginato de sódio.

Temperatura (°C)	Secagem (h)	EYp %
30	24	68,27
	48	54,73
40	24	52,21
	48	48,49

Ao analisar os valores de rendimento de processo, podemos perceber que a temperatura de 30°C com 24 horas de secagem obteve o melhor rendimento entre todas as amostras,

Nota-se que mesmo a técnica de extrusão não sendo a mais indicada e havendo uma diminuição na população de células viáveis ao fim do processo de secagem e armazenamento os rendimentos obtidos nesse estudo foram satisfatórios quando comparados a outros autores, mostrando assim a eficiência do perfil de tempo e temperatura estudados. Para o rendimento Chávarri (2010)¹³, seu estudo com microencapsulação de probióticos *B. bifidum* e *Lactobacillus gasseri* utilizando quitosana e alginato como encapsulante pela técnica de extrusão, encontrou valores variando de 19,5 a 40,2% para suas amostras.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que o processo empregado para a secagem das microcápsulas de alginato adicionadas da cultura de *Enterococcus faecium* por extrusão se mostrou eficiente para a sobrevivência dos microrganismos, contudo não se manteve durante o armazenamento.

Apesar da contagem final de probióticos estando abaixo da recomendada pela legislação que é de 10⁸ UFC/g, o processo de extrusão obteve bons rendimentos.

Uma alternativa para melhores resultados seria a cobertura das cápsulas para diminuir a porosidade, assim aumentando as condições favoráveis de sobrevivência.

REFERÊNCIAS

[1] Oliveira DLP. Produção e avaliação de micropartículas lipídicas contendo *Lactobacillus acidophilus* ou *Bifidobacterium lactis* produzidas por spray chilling. [Dissertação] Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo; 2011.

[2] Arul V, Kanmani P, Kumar SR, Yuvaraj N, Paari KA, Pattukumar V. Effect of cryopreservation and microencapsulation of lactic acid bacterium *Enterococcus faecium* MC13 for long-term storage. *Biochemical Engineering Journal*; 2011; 59(1):140-7.

[3] Cislaghi FPC, Freire CBF, Sant'anna FS. Potencial do soro de leite líquido como agente encapsulante de *Bifidobacterium* Bb-12 por *spray drying*: comparação com goma arábica. *Ciência Rural*; 2012; 42(9):1694-700.

[4] Charalampopoulos D, Cook MT, Khutoryanskiy VV, Tzortzis G. Production and Evaluation of Dry Alginate-chitosan Microcapsules as Enteric Delivery Vehicle for Probiotic Bacteria. *Biomacromolecules*; 2011; 12: 2834-40.

[5] Charalampopoulos D, Cook MT, Khutoryanskiy VV, Tzortzis G. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*; 2012; 162:56-67.

[6] Hardie J, Whiley R. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal Applied Microbiology*; 1997; 83:1-11.

[7] Rosa PRF. Produção de probióticos com *Lactobacillus* imobilizados em alginato de cálcio impregnado de soro de queijo. [Dissertação] Uberlândia – Universidade Federal de Uberlândia, 2010.

[8] Franz CMAP, Stiles ME, Scheleifer KH, Holzapfel WH. Enterococci in foods – a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*; 2003; 80:105-22.

[9] ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. IX-Lista de Alegações de Propriedades Funcional Aprovadas. Brasília, 2008. [Acesso em 20 mai. 2014]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_list_a_alega.html.

[10] VETNIL, Produtos veterinários. 2013. [Acesso em mai, 2014]. Disponível em: vetnil.com.br.

[11] ABINPET, Associação Brasileira das Indústrias de Produtos para Animais de Estimação. 2013 [Acesso em 23 de mai. 2014]. Disponível em: <http://abinpet.org.br>.

[12] McMaster LD, Kokott SA, Slatter P. Microencapsulation of *Bifidobacterium lactis* for incorporation into soft foods. *World Journal of Microbiology e Biotecnologia*; 2005; 21:723-8.

[13] Chávarri M, Marañón I, Ares R, Ibáñez FC, Marzo F, Villarán M, Del C. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*; 2010; 142:185-9.

[14] Boscarioli MP. Influência de probióticos na encapsulação de bactérias probióticas adicionadas em sorvete. [Dissertação] São Caetano do Sul: Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de tecnologia, 2010.

