

---

## **AValiação DA VIABILIDADE GASTROINTESTINAL DAS CEPAS DE *Lactobacillus acidophilus* MICROENCAPSULADO POR SPRAY DRYER E LIOFILIZAÇÃO**

MARIELI PERUZZOLO<sup>1</sup>; KALINKA KENDRA MAYESKI<sup>1</sup>; BRENDA DE SOUZA ZANCHETTA<sup>1</sup>; GIOVANA CRISTINA CENI<sup>2</sup>; ROGÉRIO LUIS CANSIAN<sup>1</sup>; GECIANE TONIAZZO BACKES<sup>1</sup>

<sup>1</sup> URI Erechim – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim – RS, Brasil

<sup>2</sup> UFSM - Universidade Federal de Santa Maria, Palmeira das Missões – RS, Brasil

\*e-mail: marciperuzzolo@yahoo.com.br

**RESUMO** - Os probióticos apresentam benefícios à saúde do hospedeiro, para exercer os efeitos benéficos os probióticos precisam estar viáveis nos produtos onde são incluídos e resistirem ao processo de digestão humana e promover a colonização e proliferação no tecido intestinal. O objetivo desse trabalho foi avaliar a viabilidade do probiótico *Lactobacillus acidophilus* (LA02) encapsulado, frente a condições de simulação *in vitro* do trato gastrointestinal. O probiótico foi encapsulado em matriz composta por 20g de maltodextrina (DE 20) e 5g de goma arábica, por liofilização e *spray dryer*. Para a digestão *in vitro* foram utilizadas enzimas digestivas e sais biliares, simulando as seções do trato gastrointestinal esôfago/estômago, duodeno e íleo, em agitação contínua a 37 °C. No início do processo a contagem microbiana foi de 6,13 Log UFC/g<sup>-1</sup> e ao final 4,33 Log UFC/g para técnica de *spray dryer*, com viabilidade de 65,90%. Na técnica de liofilização obteve-se 9,17 Log UFC/g no início do processo e terminando em 8 Log UFC/g, com viabilidade de 87,25%. O estudo mostrou que a cepa *Lactobacillus acidophilus* encapsulada pela técnica de liofilização, apresenta maior viabilidade em condições de simulação de digestão gastrointestinal.

### **INTRODUÇÃO**

Os probióticos são microrganismos vivos que estão se destacando cada vez mais entre os produtos que geram benefícios a saúde e bem estar da população, quando administrados em quantidades adequadas (Afrin et al. 2021; Frakolaki et al. 2020; Nunes et al. 2018; Yao et al. 2020).

Embora uma ampla variedade de gêneros e espécies de microrganismos sejam considerados probióticos em potencial, nem todos são aprovados para aplicação em alimentos no Brasil. Entre os aprovados encontra-se o *Lactobacillus acidophilus*, o qual faz parte importante para reconstrução da

flora intestinal e restauração da saúde humana, exercem um papel essencial na formação do desenvolvimento do sistema imunológico, têm eficiência a longo prazo na sensibilidade a vários doenças inflamatórias, como alergia e autoimunidade (Giraffa, Chanishvili, and Widayastuti 2010; Liu et al. 2019). Além disso, foram confirmados como tratamento potencial para inúmeras doenças clínicas, como diarreia, síndrome do intestino irritável, alergias, doenças hepáticas gordurosas, obesidade, diabetes, câncer (Tao et al. 2019).

No momento da ingestão um alimento com bactérias probióticas deve apresentar entre 10<sup>9</sup> a 10<sup>8</sup> Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mililitro ou grama para

garantir que no mínimo  $10^6$  UFC/g ou mL consigam atingir o cólon (Naissinger da Silva et al. 2021; Shori 2017). Para suportar o preparo dos alimentos e às condições ambientais adversas, como suco gástrico e a bile no trato gastrointestinal, os probióticos podem ser envolvidos por uma matriz protetora e ser encapsulados (Arepally, Reddy, and Goswami 2020; Han et al. 2017). A microencapsulação é um processo onde pequenas partículas sólidas, gotas líquidas ou ainda moléculas de gás são inseridas em uma camada de revestimento ou também chamado de material de parede. Tem a função de proteger o ingrediente ativo, impedindo o contato com o ambiente externo, sendo liberado ao receber estímulo no momento em que suas propriedades funcionais são necessárias (Abbas et al. 2012).

Muitos materiais podem ser utilizados como agentes encapsulantes para obtenção de uma boa cobertura para a microcápsula, dentre eles a maltodextrina e a goma arábica. A maltodextrina é amplamente utilizada como material de revestimento devido à sua não toxicidade, baixo custo, boa solubilidade, baixa viscosidade mesmo com alto teor de sólidos e disponibilidade. A sua baixa capacidade de emulsificação é potencializada em combinação com outros agentes de transporte como goma arábica (Arepally, Reddy, and Goswami 2020; Paula et al. 2019; Premi and Sharma 2017). A mesma é constituída principalmente por polissacarídeos de alto peso molecular e seus sais. Em níveis de 1 a 10 %, a goma arábica atua como formador de filme, estabilizador de umidade (Arepally, Reddy, and Goswami 2020).

Entre as diferentes metodologias de microencapsulação, a técnica por *spray dryer* conhecida por muitas décadas, é muito utilizada nas indústrias farmacêutica e alimentícia. Por apresentar baixos custos na produção industrial esta técnica torna-se muito relevante para a produção de produtos probióticos secos. Entretanto, a secagem por *spray dryer* submete o produto a altas temperaturas, o que pode levar a danos celulares (Nunes et al. 2018; Tao et al. 2019)

A liofilização é uma técnica baseada na desidratação de um produto congelado por sublimação, sendo realizado, primeiramente,

um congelamento rápido do produto seguido da sublimação do gelo sob vácuo (Azeredo 2005). Para secar probióticos encapsulados, é uma das técnicas amplamente utilizadas e é considerada como um processo de desidratação mais leve, devido à capacidade de manter um alto nível de viabilidade celular, promove maior preservação a longo prazo, juntamente com a conveniência no manuseio, armazenamento, comercialização e aplicação. É um método adequado para preservação de bactérias probióticas e outros microrganismos (Chen et al. 2017).

Nesse contexto, a presente pesquisa avaliou a viabilidade gastrointestinal *in vitro* do probiótico *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado por *spray dryer* e liofilização.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Culturas probióticas

Para esta pesquisa foi utilizado o microrganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* (LA02), doado pela empresa Probiotal S.p.A. A cultura permaneceu armazenada em temperatura de  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

### Contagem de células probióticas

Para a contagem de células probióticas seguiu-se metodologia proposta por (Naissinger da Silva et al. 2021), com adaptações. Para análise foram realizadas diluições seriadas, e alíquotas de 1,0 mL transferidas em placas de Petri para plaqueamento por profundidade utilizando meio MRS (Kasvi®), adicionado de 1% de Tween 80 (Synth®). Após a inoculação, as placas foram incubadas invertidas em jarra de anaerobiose, em estufa bacteriológica (Tecnal®) a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 72 horas. As análises foram realizadas em triplicata.

### Microencapsulação de probióticos

Para o preparo do inóculo a cultura probiótica (1 g) foi ativada em caldo MRS (Sigma-Aldrich®) (100 mL) e incubada durante 15 horas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após, foi centrifugada (MPW – 351R) a  $4670 \times g$  por 15

minutos em centrífuga refrigerada (4 °C) e lavada em solução de NaCl (0,85 % m/v) por duas vezes.

Para definição da matriz encapsulante e sua concentração foi testada metodologia proposta na literatura por Nunes et al. (2018) e Arepally, Reddy e Goswami (2020). O teste foi conduzido na seguinte condição de agente encapsulante: goma arábica (5g), maltodextrina (20g) e tween 80 (1g). Os agentes encapsulantes foram dispersos, sob agitação magnética, em 100 mL de solução tampão fosfato de sódio, pH 7,0, pré-aquecida a 50 °C, até completa dissolução. As células probióticas ativadas (1 g) foram introduzidas na solução e agitadas a 1000 rpm por 10 min (agitador IKA® RX 20digital).

Para teste em *spray dryer* (marca Lab Plant® SD-05), com bico injetor de 0,5 mm de diâmetro, a mistura (probiótico/matriz encapsulante/solução tampão) foi bombeada a uma vazão de 0,08 mL/min, na pressão de 0,08 a 0,12 bar, na temperatura de entrada de 130 °C e temperatura de saída de 44 °C.

Enquanto que para liofilizar, a mistura probiótico/matriz encapsulante/solução tampão foi congelada e após seca em liofilizador (Edwards®), em temperatura de -50 °C e pressão de câmara de 0,05 mbar, por período de 48 a 60 horas.

### Viabilidade do probiótico encapsulado em condições gastrointestinais *in vitro*

O teste de viabilidade do microrganismo probiótico encapsulado frente a condições gastrointestinais seguiu o protocolo descrito por Madureira et al. (2011) e Naissinger da Silva et al. (2021) que simula as seções do trato gastrointestinal. As análises foram realizadas em triplicata.

A análise foi conduzida em uma incubadora refrigerada tipo Shaker (Marconi®), mantida a 37 °C. Foram utilizadas alíquotas de 1 g de células probióticas adicionadas de 9 mL de água peptonada, e após submetidas às mesmas condições para simulação gastrointestinal. Previamente foram preparadas e esterilizadas em autoclave uma solução ácida (HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>) e uma solução básica (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>) para ajuste do pH das amostras ao longo da

simulação. O pH inicial foi ajustado a 6,9, para simular a acidez da boca, permanecendo em shaker com rotação de 200 rpm por dois minutos. Na etapa esôfago/estômago foi utilizado 25 mg mL<sup>-1</sup> de pepsina (Sigma®), preparada em HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Esta solução foi adicionada, em alíquotas iguais, durante toda a fase gástrica, a uma quantidade de 0,05 mL, seguindo as etapas de pH/tempo (minutos): 5,5/10 minutos, 4,6/10 minutos, 3,8/10 minutos, 2,8/20 minutos, 2,3/20 minutos e 2,0/20 minutos em uma rotação de 130 rpm. Na etapa referente ao duodeno foi utilizada uma concentração de 0,25 mL mL<sup>-1</sup> de uma solução contendo 2 g L<sup>-1</sup> de pancreatina (Sigma®) e 12 g L<sup>-1</sup> de sais biliares bovinos (Sigma®), preparadas em NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>, sendo o pH ajustado para 5,0 e permanecendo por 20 minutos a 50 rpm. A etapa referente ao íleo foi realizada por um aumento do pH para 6,5, utilizando uma solução de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>, e adicionada 0,25 mL mL<sup>-1</sup> de solução enzimática de 2 g L<sup>-1</sup> de pancreatina (Sigma®) e 12 g L<sup>-1</sup> de sais biliares bovinos (Sigma®). A amostra permaneceu por 90 minutos em rotação de 50 rpm. Ao final de cada etapa foi retirada a amostra e submetida à análise de contagem de células probióticas viáveis, conforme descrito no item anterior. A Figura 1 apresenta os estágios da simulação gastrointestinal.

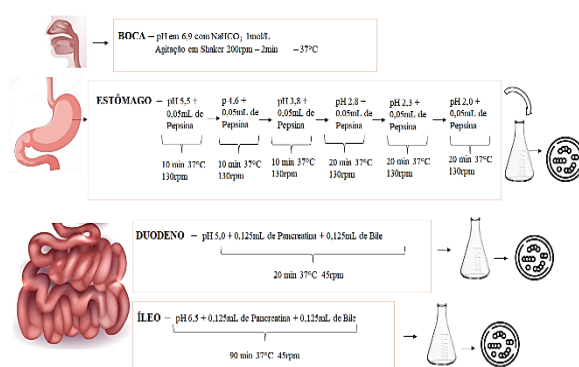


Figura 1: Estágios da simulação gastrointestinal (estômago, duodeno e íleo).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 apresenta os resultados das avaliações da viabilidade probiótica em condições que simulam a digestão gastrointestinal humana de *Lactobacillus*

*acidophilus* LA02 utilizando como material de parede 20g de maltodextrina DE20 e 5g de goma arábica e 1% de tween 80.

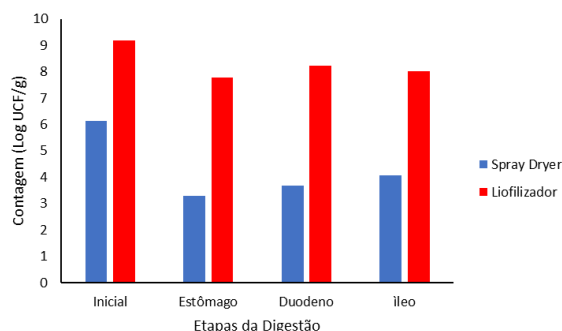


Figura 2: Viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado por *spray dryer* e liofilização em simulação de digestão no estômago e intestino delgado.

Com a propriedade de aderir às células epiteliais intestinais, os probióticos podem melhorar a microbiota e o processo digestivo, protegem contra patógenos e geram potencial propriedades anticarcinogênicas (Verruck et al. 2020). Entretanto, os benefícios do consumo apenas são alcançados quando esses microrganismos chegam vivos e em quantidade adequada até o intestino, para permitir a colonização e proliferação. Para isso é necessário sobreviver ao trânsito gastrointestinal, às condições ácidas do ambiente gástrico, às secreções biliares e pancreáticas e ser capaz de atingir o intestino (Naissinger da Silva et al. 2021), o que torna o estudo da viabilidade das cepas, em condições que simulam o processo de digestão, primordial para a avaliar possibilidades de aplicação dos mesmos. Segundo Naissinger da Silva et al. (2021), após simulação gastrointestinal considera-se uma quantidade ideal para promover o benefício da cepa no hospedeiro, uma concentração probiótica acima de 6 log UFC g<sup>-1</sup>. A avaliação da viabilidade frente a digestão *in vitro* mostra que essa cepa atende essa recomendação.

A perda de viabilidade do microrganismo encapsulado por *spray dryer* foi 1,80 log UFC g<sup>-1</sup> ao final do processo digestivo *in vitro*, e na liofilização a perda chegou a 1,17 log UFC g<sup>-1</sup>.

As cepas encapsuladas no *spray dryer* os valores obtidos para cada etapa foram

menores se comparados com o liofilizado. A contagem inicial apresentou um valor 6,13 log UFC g<sup>-1</sup>, no estômago 3,30, no duodeno 3,69 e no íleo 4,33 log UFC g<sup>-1</sup> com *spray dryer*, resultando em 65,90% de viabilidade, enquanto que para o liofilizado os valores foram de 9,17 log UFC g<sup>-1</sup> na contagem inicial, 7,78 na etapa do estômago, 8,23 no duodeno e 8,25 log UFC g<sup>-1</sup> no íleo, resultando em uma viabilidade de 87,25%. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que na liofilização a secagem remove a umidade por sublimação sob vácuo, fazendo com que o probiótico não sofra estresse térmico.

Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que a liofilização é uma técnica baseada na desidratação de um produto congelado por sublimação (Azeredo 2005). Trata-se de um processo de desidratação mais leve, devido à capacidade de manter um alto nível de viabilidade celular.

Enquanto que a microencapsulação por *spray dryer* submete os produtos a altas temperaturas o que pode levar a danos celulares (Nunes et al. 2018). Os danos celulares provavelmente são causados pela perda de proteína da parede celular, bem como pela perda de água ligada, ambas extremamente importantes para a manutenção da integridade estrutural e funcional das macromoléculas biológicas (Fávaro-Trindade e Grosso 2002).

## CONCLUSÃO

O *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado pela técnica de liofilização manteve a viabilidade na digestão gastrointestinal acima de 6 Log UFC/g em todas as etapas da digestão, enquanto que a técnica de com a técnica de *spray dryer* apenas a contagem inicial foi acima deste valor. Sendo assim essa técnica na condição encapsulante testada pode ser considerada bem sucedida para encapsulamento do probiótico em questão. A sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulados por *spray dryer* do apresentou menor taxa de sobrevivência por ter passado por altas temperatura no o que pode ter causado danos celulares.

## AGRADECIMENTOS



À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – Brasil (FAPERGS) pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, SHABBAR, CHANG DA WEI, KHIZAR HAYAT, AND ZHANG XIAOMING. 2012. “Ascorbic Acid: Microencapsulation Techniques and Trends—A Review.” *Food Reviews International* 28(4), p.343–74.
- AFRIN, SADIA, SURAIYA AKTER, SHAMIMA BEGUM, AND MD NUR HOSSAIN. 2021. “The Prospects of Lactobacillus Oris as a Potential Probiotic With Cholesterol-Reducing Property From Mother’s Milk.” *Frontiers in Nutrition* 8.
- AREPALLY, DIVYASREE, RAVULA SUDHARSHAN REDDY, AND TRIDIB KUMAR GOSWAMI. 2020. “Encapsulation of Lactobacillus Acidophilus NCDC 016 Cells by Spray Drying: Characterization, Survival after in Vitro Digestion, and Storage Stability.” *Food & Function* 11(10): p.8694–8706.
- AZEREDO, H. M. C. 2005. “Encapsulação: Aplicação à Tecnologia de Alimentos.” In *Alimentos e Nutrição*, p.89–97.
- CHEN, HAI-YAN, XIANG-YI LI, BING-JIE LIU, AND XIANG-HONG MENG. 2017. “Microencapsulation of Lactobacillus Bulgaricus and Survival Assays under Simulated Gastrointestinal Conditions.” *Journal of Functional Foods* 29 p.248–55.
- FÁVARO-TRINDADE, C. S., AND C. R. F. GROSSO. 2002. “Microencapsulation of L. Acidophilus (La-05) and B. Lactis (Bb-12) and Evaluation of Their Survival at the PH Values of the Stomach and in Bile.” *Journal of Microencapsulation* 19(4) p.485–94.
- FRAKOLAKI, GEORGIA, MARIA KATSOULI, VIRGINIA GIANNOU, AND CONSTANTINA TZIA. 2020. “Novel Encapsulation Approach for Bifidobacterium Subsp. Lactis (BB-12) Viability Enhancement through Its Incorporation into a Double Emulsion Prior to the Extrusion Process.” *LWT* 130: 109671.
- GIRAFFA, GIORGIO, NINA CHANISHVILI, AND YANTYATI WIDYASTUTI. 2010. “Importance of Lactobacilli in Food and Feed Biotechnology.” *Research in Microbiology* 161(6), p.480–87.
- HAN, QI et al. 2017. “In Vitro Comparison of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Harbin Dry Sausages and Selected Probiotics.” *Journal of Functional Foods* 32, p.391–400.
- LIU, HUAN et al. 2019. “Protective Approaches and Mechanisms of Microencapsulation to the Survival of Probiotic Bacteria during Processing, Storage and Gastrointestinal Digestion: A Review.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59(17), p.2863–78.
- MADUREIRA, A. RAQUEL et al. 2011. “Protective Effect of Whey Cheese Matrix on Probiotic Strains Exposed to Simulated Gastrointestinal Conditions.” *Food Research International* 44(1), p.465–70.
- NAISSINGER DA SILVA, MARITIELE, BRUNA LAGO TAGLIAPIETRA, VINÍCIUS DO AMARAL FLORES, AND NEILA SILVIA PEREIRA DOS SANTOS RICHARDS. 2021. “In Vitro Test to Evaluate Survival in the Gastrointestinal Tract of Commercial Probiotics.” *Current Research in Food Science* 4, p.320–25.
- NUNES, GRACIELE LORENZONI et al. 2018. “Inulin, Hi-Maize, and Trehalose as Thermal Protectants for Increasing Viability of Lactobacillus Acidophilus Encapsulated by Spray Drying.” *LWT* 89, p.128–33.
- PAULA, DANIELE DE ALMEIDA et al. 2019. “Use of Gelatin and Gum Arabic for Microencapsulation of Probiotic Cells from Lactobacillus Plantarum by a Dual Process Combining Double

Emulsification Followed by Complex Coacervation.” *International Journal of Biological Macromolecules* 133, p.722–31.

PREMI, MONICA, AND H.K. SHARMA. 2017. “Effect of Different Combinations of Maltodextrin, Gum Arabic and Whey Protein Concentrate on the Encapsulation Behavior and Oxidative Stability of Spray Dried Drumstick ( *Moringa Oleifera* ) Oil.” *International Journal of Biological Macromolecules* 105, p.1232–40.

SHORI, AMAL BAKR. 2017. “Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit.” *HAYATI Journal of Biosciences* 24(1), p.1–5.

TAO, TAO et al. 2019. “Influence of Polysaccharide as Co-Encapsulant on Powder Characteristics, Survival and Viability of Microencapsulated *Lactobacillus Paracasei* Lpc-37 by Spray Drying.” *Journal of Food Engineering* 252, p.10–17.

VERRUCK, SILVANI et al. 2020. “Evaluation of the Interaction between Microencapsulated *Bifidobacterium* BB-12 Added in Goat’s Milk Frozen Yogurt and *Escherichia Coli* in the Large Intestine.” *Food Research International* 127, p. 108690.

YAO, MINGFEI et al. 2020. “Progress in Microencapsulation of Probiotics: A Review.” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19(2), p.857–74.