

## PRESERVAÇÃO DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* UTILIZANDO XANTANA PRUNI COMO AGENTE ENCAPSULANTE

IZADORA ALMEIDA PEREZ<sup>1</sup>; JÚLIA BORIN FIORAVANTE<sup>2</sup>; VICTORIA DE MORAES GONÇALVES<sup>2</sup>; PATRÍCIA DIAZ DE OLIVEIRA<sup>2</sup>; ANGELITA DA SILVEIRA MOREIRA<sup>2</sup>; CLAIRE TONDO VENDRUSCOLO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – e-mail: izardora\_perez@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – e-mail: juliabfioravante@hotmail.com; victoriahgoncalves@hotmail.com; bilicadiaz@yahoo.com; angelitadasilveiramoreira@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas. e-mail: clairevendruscolo@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Com a busca da qualidade de vida, os alimentos deixaram de ser vistos apenas como veículo de nutrientes, adquirindo importância como uma ferramenta para a saúde e bem estar, destacando-se assim os alimentos funcionais. Estes podem ser definidos como todos os alimentos ou bebidas que, quando consumidos, podem trazer benefícios específicos, graças à presença de substâncias fisiologicamente ativas (CÂNDIDO; CAMPOS, 2005). Dentre estes, pode-se citar os probióticos, que são definidos como microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002).

Entretanto, os benefícios dos probióticos somente ocorrem quando os microrganismos estiverem significativamente viáveis nos produtos em que forem aplicados (ETCHEPARE et al., 2015). No Brasil, a legislação preconiza que a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante (BRASIL, 2008).

Em alguns tipos de alimentos, os probióticos estarão sujeitos a diversas etapas de processamento que podem ser desfavoráveis à sua viabilidade, além das características próprias do alimento, de seu armazenamento e condições de consumo. Estudos já relataram a baixa sobrevivência de microrganismos probióticos quando são adicionados como células livres aos alimentos (CAVALHEIRO et al., 2015). Diante disso, diferentes tecnologias estão sendo empregadas a fim de ampliar a viabilidade dos microrganismos probióticos nos alimentos, dentre estes processos, pode-se citar a encapsulação *por spray drying*, uma das metodologias mais empregadas, uma vez que apresenta grande disponibilidade de equipamentos, baixo custo do processo e possibilidade de emprego de uma ampla variedade de agentes encapsulantes com estabilidade do produto final (SANTOS, 2013).

A xantana é um polissacarídeo sintetizado por espécies de bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas*. Apresenta uma grande importância na indústria de alimentos devido às suas propriedades reológicas, as quais proporcionam a formação de soluções viscosas até mesmo em baixas concentrações e é estável em ampla faixa de pH e temperatura. Além disso, a goma xantana não é digerível, o que auxilia na passagem do alimento pelo trato gastrointestinal (LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009). Denomina-se xantana pruni a xantana produzida por *X. arboricola* pv pruni, que possui propriedades químicas e físicas que a distinguem das xantanas comerciais (VENDRUSCOLO et al., 2013).

Objetivou-se com este estudo preservar o probiótico *Lactobacillus acidophilus* através da técnica de secagem por *spray dryer*, utilizando xantana

pruni como agente encapsulante, bem como avaliar a viabilidade do microrganismo em diferentes períodos e condições de armazenamento.

## 2. METODOLOGIA

O microrganismo probiótico utilizado foi o *L. acidophilus* ATCC 4356, fornecido pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCTA/FAEM/UFPEL.

Na solução encapsulante utilizou-se o agente encapsulante xantana pruni, produzida no Laboratório de Biopolímeros, do CDTEC/UFPEL sob condições operacionais e de meio de cultura como descrito no pedido de patente WO/2006047845 (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 2006),; e o antiumectante/antiagregante Aerosil®. Elaborou-se 4 tratamentos variando-se a concentração dos agentes encapsulante e antiagregante (Tab. 1),. Após, as soluções foram esterilizadas.

**Tabela 1.** Tratamentos utilizados para a preservação.

Tratamentos	Formulações
T1	0,5% Xantana + 0,5% Aerosil
T2	2,0% Xantana + 0,5% Aerosil
T3	0,5% Xantana + 2,0% Aerosil
T4	2,0% Xantana + 2,0% Aerosil

**Encapsulação:** o inóculo foi produzido através de culturas puras de *L. acidophilus* ATCC 4356; seu crescimento foi em placas de Petri com meio sólido MRS (De Man, Rogosa e Sharp), 37 °C por 72 h; após, as células foram ressuspensas em meio líquido MRS e incubadas em agitador orbital (Shaker) a 150 rpm, e 37 °C por cerca de 16 h, até que fosse atingida a DO<sub>600</sub> (densidade óptica) igual a 1. Para separação das células e adição das mesmas na solução encapsulante, o inóculo foi centrifugado a 10000 x g a 4 °C por 10 min para formação de *pellet* celular, que foi ressuspensado em mesmo volume da solução encapsulante. A secagem foi realizada em *spray dryer* LabMq (MSD 1.0), com temperatura de entrada de 120°C, na saída de 60°C, fluxo de ar de 3L.h<sup>-1</sup> e velocidade de entrada de 0.4 L.h<sup>-1</sup>. Os pós produzidos foram envasado em frascos tipo penicilina e armazenados à temperatura ambiente (±25°, em dessecador), sob refrigeração (7°C) e sob congelamento (-18°C).

**Avaliação da viabilidade:** a viabilidade inicial (dia 0) dos microrganismos liofilizados e após armazenamento por 7, 15, 30, 60 e 120 dias foi determinada conforme Antunes et al. (2013). Foram adicionados 0,01 g das partículas a 1 mL de solução tampão fosfato 0,05 M e submetidos à agitação de 150 rpm e 37°C durante 3h. Após, determinou-se a concentração dos microrganismos liberados realizando-se diluições decimais seriadas, inoculando-as em placas de Petri contendo meio MRS ágar que foram incubadas a 37°C em jarras de anaerobiose por 72 h; por fim fez-se contagem as unidades formadoras de colônia por placa e correção da diluição para expressão dos resultados em Log UFC.g<sup>-1</sup>.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de xantana como agente encapsulante é capaz de reduzir a injúria celular frente ao processo de secagem por *spray dryer* sob temperaturas elevadas. De acordo com Nunes et al. (2015), essa técnica serve como proteção para os probióticos, sendo que a viabilidade dos microrganismos durante o processo e posterior estocagem do pó está relacionada com fatores como a cepa utilizada, temperaturas de entrada e saída no equipamento e também com o tipo

de agente encapsulante. Os resultados obtidos para a concentração de microrganismo na avaliação da viabilidade das partículas estão na tabela 2.

**Tabela 2.** Concentração de microrganismos (UFC g<sup>-1</sup>) viáveis nas partículas nos diferentes tratamentos, dias e condições de armazenamento.

Trat.	Armazenamento (dias)					
	0	7	15	30	60	120
T1A	9,64±0,01 <sup>Aa</sup>	7,31±0,00 <sup>FGb</sup>	7,28±0,03 <sup>Deb</sup>	7,15±0,13 <sup>Eb</sup>	6,46±0,11 <sup>Dc</sup>	0,00±0,00 <sup>Dd</sup>
T1R	9,64±0,01 <sup>Aa</sup>	7,53±0,04 <sup>Ec</sup>	7,81±0,03 <sup>BCDb</sup>	7,46±0,06 <sup>Dc</sup>	7,12±0,08 <sup>Cd</sup>	5,68±0,06 <sup>Abe</sup>
T1C	9,64±0,01 <sup>Aa</sup>	8,24±0,01 <sup>Db</sup>	7,68±0,54 <sup>CDb</sup>	8,05±0,01 <sup>Cb</sup>	7,57±0,04 <sup>Bb</sup>	5,83±0,06 <sup>Ac</sup>
T2A	9,60±0,06 <sup>Aa</sup>	8,38±0,01 <sup>Cb</sup>	7,27±0,03 <sup>Dec</sup>	7,08±0,03 <sup>Ec</sup>	5,55±0,14 <sup>Efe</sup>	0,0±0,00 <sup>Df</sup>
T2R	9,60±0,06 <sup>Aa</sup>	8,54±0,02 <sup>Abb</sup>	8,37±0,02 <sup>Abb</sup>	8,31±0,01 <sup>Bb</sup>	7,08±0,03 <sup>Cc</sup>	5,54±0,12 <sup>Bd</sup>
T2C	9,60±0,06 <sup>Aa</sup>	8,58±0,02 <sup>ABb</sup>	8,52±0,01 <sup>Ab</sup>	8,31±0,01 <sup>Bc</sup>	8,09±0,06 <sup>Ad</sup>	5,79±0,04 <sup>ABe</sup>
T3A	9,58±0,00 <sup>Aa</sup>	7,23±0,04 <sup>Gc</sup>	7,63±0,04 <sup>CDb</sup>	6,73±0,15 <sup>Fd</sup>	5,37±0,10 <sup>Fe</sup>	0,00±0,00 <sup>Df</sup>
T3R	9,58±0,00 <sup>Aa</sup>	8,53±0,01 <sup>ABb</sup>	8,14±0,01 <sup>ABCc</sup>	8,41±0,03 <sup>Abd</sup>	5,77±0,02 <sup>Ee</sup>	5,04±0,06 <sup>Cf</sup>
T3C	9,58±0,00 <sup>Aa</sup>	8,58±0,03 <sup>ABb</sup>	8,58±0,09 <sup>Ab</sup>	8,57±0,01 <sup>Ab</sup>	6,37±0,01 <sup>De</sup>	5,1±0,14 <sup>Cf</sup>
T4A	9,61±0,01 <sup>Aa</sup>	7,40±0,01 <sup>Fb</sup>	6,99±0,06 <sup>Ec</sup>	7,02±0,02 <sup>Ec</sup>	5,39±0,12 <sup>Fd</sup>	0,00±0,00 <sup>De</sup>
T4R	9,61±0,01 <sup>Aa</sup>	8,49±0,04 <sup>Bb</sup>	7,22±0,03 <sup>DEc</sup>	7,15±0,03 <sup>Ec</sup>	6,17±0,03 <sup>Dd</sup>	5,04±0,06 <sup>Ce</sup>
T4C	9,61±0,01 <sup>Aa</sup>	8,59±0,01 <sup>Ab</sup>	8,25±0,01 <sup>ABCc</sup>	7,90±0,01 <sup>Cd</sup>	6,37±0,01 <sup>De</sup>	4,95±0,07 <sup>Cf</sup>

Médias e desvio padrão. Teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras maiúsculas diferem entre si na coluna, letras minúsculas diferem entre si na linha. Trat. = Tratamentos; A = ambiente; R = refrigeração; C = congelado.

Em relação às condições de armazenamento, pôde-se observar que as partículas armazenadas sob congelamento tiveram concentração de microrganismos superior em todos os tratamentos, diferenciando-se durante todo o período avaliado das demais condições. Silva *et al.* (2014) realizaram a microencapsulação de *B. animalis* e *L. acidophilus* utilizando uma solução contendo diversos agentes encapsulantes. De acordo com os autores, as temperaturas inferiores auxiliam na estabilidade das células encapsuladas, evitando rearranjos no material de parede e, impedindo a exposição inadequada dos microrganismos às condições adversas, auxiliando no incremento da vida útil das partículas. Além disso, as baixas temperaturas provocaram redução no metabolismo e no ciclo de reprodução dos microrganismos. Já as partículas armazenadas sob temperatura ambiente tiveram concentração de microrganismos bastante inferior, não havendo sobrevivência em 120 dias em nenhum dos tratamentos. A concentração permaneceu de acordo com a legislação apenas até 30 dias de armazenamento.

O T2, com 2,0% Xantana e 0,5% Aerosil e o T3 com 0,5% de Xantana e 2,0% Aerosil foram os que tiveram melhores resultados na maioria dos tempos; provavelmente porque continham uma quantidade (2,5g) de sólidos adicionados mais adequada, não excessiva nem insuficiente para promover a proteção dos microrganismos.

#### 4. CONCLUSÕES

A xantana pruni pode ser utilizada eficientemente como agente encapsulante do microrganismo probiótico *L. acidophilus*, sendo que os melhores tratamentos foram o T2 e o T3. O congelamento foi a condição de estocagem que proporcionou as maiores viabilidades, em todo o tempo de armazenamento.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES A.E.C.; LISERRE, A.M.; COELHO A.L.A. ; MENEZES C.R.; MORENO, I.; YOTSUYANAGI K., AZAMBUJA N.C. Acerola nectar with added

microencapsulated probiotic. **LWT - Food Science and Technology** .v. 54, p.125-131, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em: 15 fev. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, 09 de janeiro de 2002.

CANDIDO, L.M.B.; CAMPOS, A.M. Alimentos Funcionais. Uma Revisão. **Boletim da SBCTA**. v. 29, n. 2, p. 193-203, 2005.

CAVALHEIRO, C.P.; ETCHEPARE, M.A.; SILVEIRA, M.F.; MENEZES, C.; MENEZES, C.R.; FRIES, L.L.M. Encapsulação: alternativa para a aplicação de microrganismos probióticos em alimentos termicamente processados. **Ciência e Natura** v.37, Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, Santa Maria, p. 65-74, 2015.

ETCHEPARE, M.A.; MENEZES, M.F.S.C.; BARRETO, A.R.; CAVALHEIRO, C.P.; MENEZES, C.R. Microencapsulação de probióticos pelo método de extrusão associado a interações eletrostáticas. **Ciência e Natura** v.37, Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, Santa Maria, p. 75-86, 2015.

NUNES, G. L. et al. Microencapsulação de culturas probióticas: princípios do método de spray drying. **Ciência e Natura** [da] Universidade Federal de Santa Maria. v.37, Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, p. 132 – 141, dez. 2015.

LUVIELMO, M.M.; SCAMPARINI, A.R.P. Goma xantana: produção, recuperação, propriedades e aplicações. **Estudos tecnológicos**, v.5, nº 1, p. 50-67, 2009.

SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. de A. F. **Probióticos e prebióticos em alimentos**: Fundamentos e aplicações tecnológicas. 1ed. São Paulo: Varela, 2011. 669p.

SANTOS, R. C. S. dos. **Microencapsulação de Lactobacillus casei por spray drying**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2013.

SILVA, P. T.; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R. de; SILVA, C. de B.; SORIANI, H. H.; BASTOS, J. de O.; MOTTA, M. H.; RIBEIRO, R. F. Microencapsulação de probióticos por spray drying: avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento. Santa Maria/RS. **Revista Ciência Rural**, 2014

VENDRUSCOLO, C. T. ; MOREIRA, A. da S. . Xantana pruni: biopolímero de isolado de clima sub-tropical. In: Márcia do Vale Barreto Figueiredo;Deise Maria Passos da Silva;José de Paula Oliveira;José Nildo Tabosa;Fernando Gomes da Silva;José Teodorico de Araújo Filho. (Org.). **Estratégia para uma Agricultura Sustentável**. 04ed.Recife: CCS- Gráfica e Editora, 2013, v. 1, p. 31-58.