

ESTUDO PRELIMINAR DO ROMPIMENTO DE MICROCÁPSULAS DE *Pediococcus pentosaceus* – P107 PRODUZIDAS POR SPRAY DRYING

FERNANDA WEBER BORDINI¹; MICHELE DUTRA ROSOLEN²; GABRIELA DE QUADROS DA LUZ³; PATRÍCIA DIAZ DE OLIVEIRA⁴; ÂNGELA MARIA FIORETINI⁵; SIMONE PIENIZ⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – fernandawbordini@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – michele.dutra@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - ql.gabi@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – bilica.diaz@yahoo.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – angefiore@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – nutrisimone@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, diversos estudos com isolamento e caracterização de probióticos de diferentes fontes vem se destacando (KANG et al., 2016; SHOKRYAZDAN et al., 2017; VERÓN et al., 2017). Assim como a importância de uma microbiota saudável a qual atua em diversos sistemas fisiológicos do corpo humano contribuido para a saudabilidade do individuo (SAAD, 2006).

Esses micro-organismos com potencial probióticos geralmente são pertencentes ao grupo de bactérias ácido lácticas, as quais são consideradas como *generally recognized as safe* (GRAS), ou seja, geralmente seguras para o uso em alimentos, catalase negativa, Gram positivas, entre outras características. Dentre este grupo encontra-se o *Pediococcus pentosaceus* o qual apresenta formato de cocos, é imóvel, não formador de esporos e utilizado como cultura *starter* na indústria láctea (PORTO et al., 2017).

Visando o melhoramento e a potencialização dos efeitos benéficos dos probióticos, surge a microencapsulação, como uma alternativa de proteção para esses micro-organismos, aumentando seu tempo de armazenamento, melhorando e possibilitando sua aplicação em diferentes alimentos, propiciando resistência ao tratamento térmico, tolerância a passagem pelo trato gastrintestinal entre outros benefícios. (BAMPI et al., 2016; ECKERT et al., 2017; GODERSKA, 2012) Uma das técnicas mais empregadas para tais resultados é a secagem por atomização, ou *spray drying*, que consiste na rápida desidratação do material encapsulante com temperaturas elevadas, formando microcápsulas (PINTO et al., 2015).

Diferentes materiais encapsulantes tem sido utilizados, dentre eles alguns prebióticos, gomas e resíduos industriais, como por exemplo o soro de queijo (ECKERT et al., 2018; MACIEL et al., 2014)

Para validação destes estudos e acompanhamento destas microcápsulas aos testes submetidos, é necessário promover seu rompimento a fim de obter a contagem de células viáveis do micro-organismo encapsulado. Para tal os trabalhos relatados na literatura utilizam o tampão salina-fosfato (PBS) de 100 mM, chamado de tampão de rompimento de microcápsulas por alguns autores. Na literatura são demonstrados diferentes tempos de rompimento por este método, mas de forma geral são períodos curtos com sucesso na ruptura das microcápsulas (PINTO et al., 2015; WANG et al., 2016).

Partindo do exposto acima, o objetivo deste estudo foi avaliar as condições de rompimento de diferentes microcápsulas contendo *Pediococcus pentosaceus*-P107 obtidas pela técnica de *spray drying*.

2. METODOLOGIA

2.1 Estirpe bacteriana e condições de cultivo

Para otimização do crescimento celular, *Pediococcus pentosaceus*-P107 (*P. pentosaceus*-P107) foi previamente cultivado em soro de queijo (Relat - Estação, RS, Brasil) reconstituído a 6% e pasteurizado à 65 °C por 30 minutos. O inóculo foi adicionado numa concentração de 3% para reativação em agitador orbital (CERTOMAT BS-1, Germany) à 37 °C, 180 rpm por 16 horas, e após foi cultivado em biorreatore de bancada (BIOSTAT B -New Brunswick, EUA), overnight, à 37 °C e 100 rpm, sendo que ambos cultivos foram realizados sob anaerobiose.

Ao final do processo de cultivo as células de *P. pentosaceus* – P107 foram centrifugadas a 2370 g por 10 min a 4 °C e o pellet foi lavado em tampão PBS (10 mM, pH 7,0).

2.2. Produção das microcápsulas

Três materiais encapsulantes foram preparados: soro de queijo e aerosil soro de queijo associado a pectina e aerosil (SQP) e soro de queijo mais goma xantana e aerosil (SQX).. Ambos materiais foram pasteurizados a 65 °C por 30 minutos. Após o preparo das solução encapsulantes o pellet de *P. pentosaceus* – P107 foi acrescentado e mantido sob agitação magnética até o momento no qual foram submetidas ao processo de secagem utilizando spray dryer (LabMaq – MSDi 1.0, São Paulo, SP, Brasil). Os parâmetros utilizados foram 100 °C de temperatura de entrada, 68 °C de temperatura de saída, com fluxo de alimentação de 0,25 L h⁻¹ e fluxo de ar de secagem 3,00 m³ min⁻¹. O produto final seco foi coletado em frascos estéreis e armazenado em diferentes temperaturas. O processo de encapsulação e subsequentes análises foram realizadas em triplicata. Foram obtidas partículas em tamanho micrométrico.

2.3 Teste de rompimento das microcápsulas

Para determinar o rompimento das microcápsulas duas soluções foram utilizadas, o tampão PBS (100 mM, pH 7,4) e solução salina 0,5% (m v⁻¹) pH 2,5 contendo 3 mg mL⁻¹ de pepsina. Para tal, 0,01 g de cada microcápsula foi ressuspensa em 1 mL das soluções, agitadas em vórtex e mantidas em agitador orbital a 150 rpm a 37 °C nos tempos de 30, 60 e 120 min. A contagem das células viáveis foi determinada por diluição seriada em água peptonada 0,15% (m v⁻¹) e alíquotas dessas diluições foram plaqueadas em ágar MRS (de Man, Rogosa and Sharpe), incubadas a 37 °C por 48 h em jarras de anaerobiose e a concentração das células viáveis foi expressa log UFC g⁻¹.

2.4 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), usando o software GraphPad 7.0, seguida pelo teste de Tukey para comparação das médias, com nível de significância de 5%, quando encontradas diferenças significativas entre os tratamentos. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os dados expressos como média ± desvio padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme é possível observar na Tabela 1 para a microcápsula de soro de queijo (SQ) não há diferença significativa entre os tempos quando avaliado o rompimento com tampão PBS 100 mM, pH 7,4 (PBS) e solução salina 0,5% pH

2,5 e pepsina 3 mg mL⁻¹ (Solução ácida) quando analisados isoladamente. Mas quando comparados o rompimento em PBS se mostra significativo em relação a solução ácida, visto que a concentração celular é maior (12,85 Log UFC⁻¹), possivelmente pela maior exposição do micro-organismo. O estudo de ECKERT et al., (2017) produziu microcápsulas de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 com soro de queijo, utilizando tampão PBS 100 mM para rompimento no tempo de 15 minutos, assim como DE CASTRO-CISLAGHI et al., (2012) que utilizou o mesmo método por 10 minutos. Pode-se inferir que a cápsula do presente estudo resistente a mesma condição, possivelmente em virtude do material encapsulante, aos parâmetros do equipamento de secagem ou até mesmo interferência do micro-organismo utilizado.

Para microcápsula de soro de queijo e pectina (SQP) o tampão PBS não foi capaz de expor as células de *P. pentosaceus* -P107 em 120 minutos de análise. Porém quando em contato com a solução ácida no tempo de 30 minutos se mostrou eficiente para o rompimento e exposição do micro-organismo, ao passo que os demais pontos se mantiveram iguais ou em menor densidade celular (13 Log UFC⁻¹). Na literatura é possível observar que microcápsulas envolvendo pectina e soro como material encapsulante como é o caso do estudo de GEREZ et al., (2012) foi rompida com uma solução de citrato a 2% por 15 minutos, o qual também usou uma solução diferente de tampão PBS para realizar o rompimento de microcápsulas como pectina associada ao soro de leite.

Quando analisada a microcápsula de soro de queijo associado a goma xantana o rompimento desta em PBS mostrou diferença significativa entre os tempos avaliados, aumentando a contagem celular conforme o decorrer do tempo de exposição. Ao contrário da solução ácida na qual ao passar do tempo há uma diminuição da contagem celular de *P. pentosaceus*-P107. Na literatura não é encontrado trabalhos que utilizem esta goma para microencapsulação de probióticos por spray drying, mas o estudo de CASTRO-CISLAGHI; FRITZEN-FREIRE; SANT'ANNA, (2012) que produziu microcápsula de *Bifidobacterium* Bb-12, com soro de leite e goma arábica por spray drying utilizou para enumeração o tampão PBS de 100 mM por 10 minutos, diferindo do presente estudo no qual a solução ácida promoveu uma melhor ruptura das microcápsulas de soro de queijo e goma xantana.

Tabela 1. Teste de rompimento das microcápsulas utilizando diferentes soluções e tempos de análise. Os dados foram expresso em log UFC g⁻¹.

Tempo (min)	Tampão PBS 100 mM pH 7,4			Solução salina 0,5% pH 2,5 e pepsina 3 mg mL ⁻¹		
	SQ	SQP	SQX	SQ	SQP	SQX
30	12,85 (0,34) ^{a,A}	0,00 (0,00)	7,09(0,13) ^{a,B}	8,92 (0,07) ^{a,B}	13,63 (0,15) ^a	13,00 (0,00) ^{a,A}
60	12,69 (0,10) ^{a,A}	0,00 (0,00)	8,15(0,15) ^{b,B}	8,76 (0,26) ^{a,B}	9,15 (0,15) ^b	11,58 (0,51) ^{b,A}
120	11,87 (0,67) ^{a,A}	0,00 (0,00)	9,15(0,15) ^{c,B}	9,50 (0,64) ^{a,B}	9,00 (0,00) ^b	12,77 (0,68) ^{a,b,A}

Os resultados representam a média (desvios padrão), n=3. ^{a-c} Médias com letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma coluna representam diferença estatística ($p < 0,05$). ^{A-B} Médias com letras maiúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha referente a mesma amostra representam diferença estatística ($p < 0,05$).

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que pelo processo de microencapsulação empregado neste trabalho foi capaz de produzir três microcápsulas de *P. Pentosaceus*-P107 com características diferentes de rompimento, algumas não sugeridas na literatura até o presente momento, demonstrando a característica insolúvel de duas amostras analisadas (SQP e SQX). Estas teriam grande potencial na indústria alimentícia, visto a capacidade de resistir as condições adversas e expor suas células somente mediante a condições ácidas e enzimáticas, as quais mimetizam o trato gástrico humano.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAMPI, Gabriel Bonetto et al. Spray Chilling Microencapsulation of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium animalis subsp. lactis and Its Use in the Preparation of Savory Probiotic Cereal Bars. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 1422–1428, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11947-016-1724-z>>
- CASTRO-CISLAGHI, Fabiane Picinin De; FRITZEN-FREIRE, Carlise Beddin; SANT'ANNA, Ernani Sebastião. Potencial do soro de leite líquido como agente encapsulante de Bifidobacterium Bb-12 por spray drying: comparação com goma arábica. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 42, n. 9, p. 1694–1700, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782012000900028&lng=pt&tlang=pt>
- DE CASTRO-CISLAGHI, Fabiane Picinin et al. Bifidobacterium Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 113, n. 2, p. 186–193, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.06.006>>
- ECKERT, Camila et al. Microencapsulation of Lactobacillus plantarum ATCC 8014 through spray drying and using dairy whey as wall materials. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 82, p. 176–183, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.045>>
- ECKERT, Camila et al. Development of alginate-pectin microparticles with dairy whey using vibration technology: Effects of matrix composition on the protection of Lactobacillus spp. from adverse conditions. **Food Research International**, [s. l.], v. 113, n. June, p. 65–73, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.001>>
- GEREZ, C. L. et al. Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic Lactobacillus rhamnosus CRL 1505 to low pH. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 54, n. 6, p. 552–556, 2012.
- GODERSKA, Kamila. Different Methods of Probiotics Stabilization. **Probiotics**, [s. l.], p. 541–550, 2012.
- KANG, Chang Ho et al. Isolation of Lactobacillus strains from shellfish for their potential use as probiotics. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 46–52, 2016.
- MACIEL, G. M. et al. Microencapsulation of Lactobacillus acidophilus La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 97, n. 4, p. 1991–1998, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030214000964>>
- PINTO, Stephanie S. et al. Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect Bifidobacterium-BB-12 microencapsulated by spray drying. **Food Research International**, [s. l.], v. 67, p. 400–408, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.038>>
- PORTO, Maria Carolina W. et al. Pediococcus spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 361–374, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.004>>
- SAAD, Susana Marta Isay. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 1–16, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322006000100002&lng=pt&nrm=iso&tlang=pt>
- SHOKRYAZDAN, Parisa et al. Probiotics: From Isolation to Application. **Journal of the American College of Nutrition**, [s. l.], v. 36, n. 8, p. 666–676, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/07315724.2017.1337529>>
- VERÓN, Hernán E. et al. **Isolation and selection of potential probiotic lactic acid bacteria from Opuntia ficus-indica fruits that grow in Northwest Argentina**. [s.l.] : Elsevier Ltd, 2017. v. 84 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.058>>
- WANG, Lijun et al. Effect of skim milk coated inulin-alginate encapsulation beads on viability and gene expression of Lactobacillus plantarum during freeze-drying. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 68, p. 8–13, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.001>>