

## **AVALIAÇÃO DA $\beta$ -CICLODEXTRINA COMO AGENTE PROTETIVO DE MICROCÁPSULAS DE PROBIÓTICOS SECAS POR LIOFILIZAÇÃO.**

Rafaela Battaglini Santaella (PIBIC/CNPq), Rita de Cássia Bergamasco (Orientador),  
e-mail: rbergamasco@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Tecnologia / Maringá, PR.

**Área: Ciências Agrárias. Subárea: Engenharia de alimentos.**

**Palavras-chave:**  $\beta$ -ciclodextrina, microencapsulação, liofilização

### **Resumo:**

Os microrganismos probióticos têm sido incorporados nos mais diversos tipos de alimentos por causa de seus benefícios, porém existem diversos problemas em relação a viabilidade e resistência das culturas probióticas quando aplicados em um produto alimentício. A microencapsulação de probióticos e a secagem das microcápsulas por liofilização são ferramentas utilizadas com o propósito de aumentar a viabilidade destes em um sistema alimentício. Além disso, a suplementação com agentes crioprotetores pode apresentar efeitos notáveis na viabilidade durante a desidratação. Neste trabalho, a  $\beta$ -ciclodextrina foi avaliada como um potencial agente crioprotetor das microcápsulas de probióticos secas por liofilização. As microcápsulas foram preparadas pela técnica de extrusão, usando alginato de sódio e quitosana como agentes encapsulantes. As microcápsulas formadas foram suspensas em soluções de diferentes concentrações de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), e secas por liofilização. Os resultados permitiram observar que a  $\beta$ -CD agiu como um crioprotetor durante o preparo e secagem das microcápsulas por liofilização, além de atuar na manutenção da viabilidade dos microrganismos durante a estocagem a  $-6^{\circ}\text{C}$ .

### **Introdução**

Microrganismos probióticos, quando empregados em alimentos com alegação de propriedade funcional, devem apresentar resistência às operações de processamento, e viabilidade durante o período de armazenamento do produto. Um alimento comercializado com alegações de efeitos benéficos à saúde, a partir da adição de probióticos, deve conter um número de células viáveis de culturas probióticas de, no mínimo,  $10^8$  UFC/ mL (AKIN et al., 2007). No entanto ainda existem diversos problemas quanto à viabilidade de probióticos em produtos alimentícios devido ao tipo de processamento.

Para tanto, pesquisas têm demonstrado que as culturas probióticas podem ser significativamente protegidas por meio da técnica de microencapsulação. Essa técnica consiste no revestimento de microrganismos por uma matriz encapsulante, possibilitando a utilização destes em uma ampla variedade de produtos e em diversas formas. Na área de alimentos tem sido uma alternativa empregada para resolver os problemas de instabilidade e inviabilidade de probióticos (KAILASAPATHY, 2009).

Diferentes processos, dentre eles a liofilização, considerado um processo de desidratação mais leve, devido ao uso da baixa temperatura, e resultando na manutenção de um alto nível de células viáveis. (HALIM et al., 2017).

Contudo, a liofilização também apresenta efeitos negativos aos microrganismos, e este problema pode ser superado pela incorporação de agentes crioprotetores. Um agente crioprotetor é uma substância usada para proteger tecidos biológicos das injúrias causadas pela liofilização. Na encapsulação de probióticos, crioprotetores são adicionados nas formulações para manter a viabilidade das células durante o processo de liofilização (Amine et al., 2014). Um potencial crioprotetor de probióticos durante a secagem por liofilização, são as ciclodextrinas, oligossacarídeos cíclicos compostos de unidades residuais de glicose com ligações do tipo  $\alpha\rightarrow1,4$  (ALBERTINI et al. 2010).

Diante do exposto acima, o objetivo deste trabalho foi avaliar a  $\beta$ -CD como um potencial agente protetivo de microrganismos probióticos microencapsulados pela técnica de extrusão, e secos por liofilização.

## Materiais e métodos

### *Microencapsulação e secagem por liofilização*

A microencapsulação foi executada por meio da técnica de extrusão, de acordo com metodologia descrita por Halim et al. (2017). Foi preparada uma solução de alginato de sódio (2%), e misturada com uma suspensão de microrganismos probióticos do gênero *Bifidobacterium bifidum* 12 (1,5%). Esta solução foi extrusada, por meio de uma seringa, em uma solução de cloreto de cálcio (0,5 M), para que ocorresse a formação das microcápsulas. Após a extrusão, as microcápsulas foram deixadas em repouso por 40 minutos, e então lavadas com água destilada. Em seguida, as microcápsulas foram suspensas em uma solução de quitosana (4%), que atuou como uma cobertura das amostras. Posteriormente, as microcápsulas foram novamente lavadas com água destilada, suspensas em água peptonada, ou solução de  $\beta$ -ciclodextrina conforme a formulação, e então congeladas com nitrogênio líquido e liofilizadas em liofilizador de escala laboratorial (Alpha 1- LSC 4, Cristo, Alemanha), operando a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O produto seco foi coletado em um recipiente estéril e estocado para posterior enumeração dos microrganismos probióticos.

As formulações preparadas foram:

F1: microcápsulas suspensas em água peptonada

F2: microcápsulas suspensas em solução de  $\beta$ -ciclodextrina (0,5%)

F3: microcápsulas suspensas em solução de  $\beta$ -ciclodextrina (1%)

Foi preparada uma formulação contendo somente microrganismos probióticos suspensos em água peptonada (F4), para efeitos de comparação.

### *Enumeração de microrganismos probióticos*

Para a contagem dos microrganismos nas microcápsulas, as amostras foram diluídas em tampão fosfato (0,1 M) e seriadas em tubos. Em seguida, foram semeadas em placas de Petri, contendo meio MRS agar bifidum (meio de cultura específico), por meio da técnica de semeadura por profundidade. Consequente, as placas foram incubadas invertidas em jarras contendo gerador de anaerobiose Anaerobac (Probac) a  $37^{\circ}\text{C}/48$  horas.

### *Teor de umidade*

O teor de umidade nas microcápsulas foi determinado em estufa, a 105 °C. A análise foi realizada em duplicata.

### *Estabilidade de estocagem*

As microcápsulas foram armazenadas por 1 mês, a uma temperatura de -6 °C, e após este período foi feita uma nova enumeração de microrganismos probióticos.

## **Resultados e Discussão**

As microcápsulas apresentaram um elevado teor de umidade, de 28,99%, 30,99% e 38,2%, para as formulações F1, F2 e F3, respectivamente; sendo que a formulação contendo apenas microrganismo probiótico (F4) apresentou o maior valor (61,92%). Este resultado pode estar relacionado com as condições operacionais do liofilizador, ou seja, o tempo de secagem.

É interessante observar que o teor de umidade das microcápsulas aumenta com o aumento da concentração de  $\beta$ -CD nas formulações. Uma explicação para este fato é de que a  $\beta$ -CD tem a capacidade de aprisionar moléculas em sua cavidade, como por exemplo, moléculas de água, resultando num maior teor de umidade da formulação F3.

A suspensão de microrganismos probióticos adicionados nas formulações continha  $3,4 \cdot 10^{13}$  UFC/mL, logo observa-se na Tabela 1 que houve uma redução de 5 logs na enumeração dos microrganismos durante o preparo das microcápsulas e liofilização, com exceção da formulação contendo 0,5% de  $\beta$ -CD (F2), que apresentou a maior redução de microrganismos, de 6 logs.

**Tabela 1-** Enumeração de microrganismo probiótico após a liofilização e a estocagem a -6°C

Formulação	Enumeração após a liofilização (UFC/mL)	Enumeração após a estocagem (UFC/mL)
F1	$2,35 \cdot 10^8$	$2,33 \cdot 10^7$
F2	$5,00 \cdot 10^7$	$7,33 \cdot 10^7$
F3	$2,20 \cdot 10^8$	$2,00 \cdot 10^7$
F4	$1,45 \cdot 10^8$	0

Com relação a estabilidade de estocagem, observa-se a redução de 1 log nas formulações F1 e F3, enquanto a formulação F2 manteve a enumeração de probióticos, e na formulação F4, contendo apenas microrganismos, não foi possível realizar a enumeração.

Apesar do alto teor de umidade das microcápsulas e da redução significativa dos microrganismos durante o preparo e liofilização das microcápsulas, os resultados são promissores, pois a formulação contendo  $\beta$ -CD (0,5%) manteve a viabilidade dos probióticos durante a estocagem a -6°C.

## **Conclusões**

A partir dos resultados obtidos, é possível concluir que a  $\beta$ -ciclodextrina agiu como agente crioprotetor, durante a secagem por liofilização das microcápsulas. Além disso, a  $\beta$ -CD também atuou na manutenção da viabilidade dos microrganismos microencapsulados, quando estocados a  $-6^{\circ}\text{C}$ .

### Agradecimentos

Agradecimentos à UEM, CNPq e Fundação Araucária pela oportunidade de realizar este estudo.

### Referências

- AKIN, M. B.; AKIN, M. S.; KIRMACI, Z. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. **Food Chemistry**, v. 104, p. 93-99, 2007.
- ALBERTINI, B.; VITALI, B.; PASSERINI, N.; CRUCIANI, F.; DI SABATINO, M.; RODRIGUEZ, L.; BRIGIDI, P. Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.40, p.359-366, 2010.
- Amine KM, Champagne CP, Salmieri Sp, Britten M, St-Gelais D, Fustier P Lacroix M (2014). Effect of palmitoylated alginate microencapsulation on viability of *Bifidobacterium longum* during freeze-drying. **LWT- Food Sci Technol**, 56(1):111-117.
- HALIM, M., MUSTAFA, N. A. M., OTHMAN, M., WASOH, H., KAPRI, M. R., ARIFF, A. B. (2017). Effect of encapsulant and cryoprotectant on the viability of probiotic *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 during freeze-drying and exposure to high acidity, bile salts and heat. **LWT-Food Science and Technology**, 81, 210-216.
- KAILASAPATHY, K. Encapsulation Technologies for functional foods and nutraceutical product development. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 4, n. 6, 2009.