

APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE SECAGEM EM “SPRAY DRYER” PARA PRODUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS COM MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

RICARDO P. MICHELINI¹; ALCINA M. LISERRE²; CRISTIANO R. MENEZES³; IZILDINHA MORENO³; ADRIANE E. C. ANTUNES⁴; GUSTAVO DE M. CHAVES⁵

Nº 0901018

RESUMO

As culturas lácticas *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus* foram microencapsuladas em acetato ftalato celulose com inulina e outros compostos pela técnica de secagem por atomização em *spray dryer*. O comportamento das microcápsulas foi avaliado em soluções tampão com pH 4,5, 6,0 e 7,5. Como resultados, obteve-se contagens acima de 8 ciclos logarítmicos de células por grama para as duas espécies de bactérias após secagem a 110°C. Observou-se que um perfil de liberação controlada em função do valor de pH, devido à retenção de células em soluções com pH 4,5 e liberação total das células em soluções com pH 7,5 após 3 horas de reação. Conclui-se que a microencapsulação por secagem em *spray dryer* é viável tecnologicamente e que a utilização do acetato ftalato celulose como material de revestimento resulta em partículas com liberação controlada em função do pH.

Palavras-chave: acetato ftalato celulose, microencapsulação, *spray dryer*, probióticos.

ABSTRACT

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* and *Lactobacillus acidophilus* were entrapped in cellulose acetate phthalate with inulin and others compounds by *spray-drying* technique. Survival and in vitro release of bacteria from the microparticles were investigated under conditions with pH 4.5, 6.0 e 7.5. The number of cells released from the microparticles was higher than 8 logarithmic cycles per gram for both species, after dehydration at 110°C. These particles presented increased retention of cells within the capsules at pH 4.5, but at pH 7.5 the probiotic cells were completely released after 3 hours of reaction. It was concluded that microencapsulation by *spray drying* constitutes a viable technology, and the use of cellulose acetate phthalate allows a controlled release, according to the pH of the buffer.

Keywords: cellulose acetate phthalate, microencapsulation, *spray dryer*, probiotics.

1. BOLSISTA CNPq: TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP, * rpmichelini@yahoo.com.br

2. ORIENTADOR: Pesquisador, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP, alcina.maria@ital.sp.gov.br

3. COLABORADOR: Pesquisador, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP

4. COLABORADOR: Pesquisador, FCA/UNICAMP, Limeira-SP

5. COLABORADOR: Estagiário, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP

INTRODUÇÃO

A maior conscientização do consumidor pela incorporação da dieta a um estilo de vida saudável levou à criação de um mercado para produtos saudáveis, denominados alimentos funcionais (ARVANITOYANNIS, HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, 2005). Esses alimentos, além de fornecerem a nutrição básica, possuem potencial para promover a saúde por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional (SANDERS, 1998). Destacam-se os probióticos que são microrganismos vivos que administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, WHO, 2001; SANDERS, 2003) e os prebióticos, definidos como 'ingredientes seletivamente fermentáveis que permitem modificações específicas na composição e/ou na atividade da microbiota gastrointestinal que resultam em benefícios ao bem estar e à saúde do hospedeiro' (GIBSON *et al.*, 2004; ROBERFROID, 2007; WELLS, SAULNIER, GIBSON, 2008). Entretanto, para exercer efeitos benéficos, as bactérias probióticas precisam resistir ao alimento e à passagem pelo suco gástrico e trato intestinal, com a presença de enzimas digestivas e sais de bile.

A microencapsulação, definida como uma tecnologia de empacotamento que, com finas camadas poliméricas forma partículas denominadas microcápsulas (SANTOS *et al.*, 2000), pode ser utilizada para a proteção de células microbianas para aumentar a porcentagem de células íntegras após determinado tempo de vida-de-prateleira em alimentos e para proteger a célula bacteriana da ação do trato gastrointestinal.

A técnica de secagem e microencapsulação por *spray dryer* além de produzir um produto de boa qualidade, é econômica e pode ser aplicada em grandes escalas na indústria de alimentos (JACKSON, LEE, 1993). O agente encapsulante ideal para esse processo deve possuir boa capacidade emulsificante e de formação de filme, ter baixa viscosidade em altas concentrações de sólidos, sabor pouco acentuado, estabilidade e boa proteção ao material ativo (SHAHIDI, HAN, 1993; Jackson e Lee, 1993). Porém, a desvantagem desse processo é a alta temperatura utilizada para a secagem, podendo inviabilizar a aplicação com culturas. Todavia, ajustes adequados na metodologia podem permitir a obtenção de culturas encapsuladas viáveis (KAILASAPATHY, 2002).

Os objetivos deste trabalho foram o desenvolvimento de micropartículas com culturas probióticas (*L. acidophilus* e *B. animalis*) e inulina pelo método de microencapsulação por secagem em *spray dryer* sob diferentes condições de processamento, e a avaliação dessas micropartículas em soluções tampão com pH 4,5, 6,0 e 7,5.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o processo de microencapsulação, foram utilizadas as culturas probióticas *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, além dos seguintes materiais: acetato ftalato de celulose (CAP), maltodextrina, glicerol, inulina, Tween 80 e leite reconstituído. As culturas *B. animalis* e *L. acidophilus* foram reativadas com leite desnatado e caldo MRS, respectivamente, centrifugadas e lavadas em salina (0,85%) por duas vezes. Para a encapsulação através da técnica de secagem em *Spray Dryer* utilizou-se a fórmula apresentada na Tabela 1. A formulação com *B. animalis* foi submetida a secagem com diferentes temperaturas do ar de entrada (110° C, 130° C e 160° C), enquanto que a formulação com LA5 foi desidratada a 110° C. O equipamento utilizado para a microencapsulação foi o aparelho de *Spray Dryer* modelo Buchi-290 com bico pulverizador de 1,5 milímetro de diâmetro e capacidade de evaporação de 1,0L/hora.

Tabela 1. Formulação do material de revestimento que foi atomizado e seco no Spray dryer.

Reagentes	Formulação Padrão (FP)
Tampão fosfato pH 8,0	100 ml
CAP – Acetato ftalato de celulose	7,5g
Glicerol	3,5g
Maltodextrina	2,0g
Inulina	1,0g
Tween 80	0,1g
Leite reconstituído	3,0g

Após a obtenção das partículas desidratadas, cada amostra foi dissolvida em solução tampão fosfato ajustada em pH 6,0 e pH 7,5, e solução tampão acetato ajustada em pH 4,5. As soluções foram submetidas à agitação, sendo alíquotas retiradas após 60, 120 e 180 minutos de cada. As populações de *L. acidophilus* foram enumeradas em ágar MRS e de *B. animalis* em agar MRS suplementado com cloreto de lítio (0,1%), propionato de sódio (0,3%) e L-cisteína (0,05%) pela técnica de semeadura em profundidade e incubação a 37° C em anaerobiose por 72 horas. Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística (ANOVA e Teste de Tukey com o *software* STATISTICA 5.0®, Statsoft). As amostras também foram submetidas, posteriormente, a análise por microscopia óptica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que a metodologia de formação de partículas por secagem em *spray dryer* é tecnologicamente viável para a produção de micropartículas caracterizadas como matrizes poliméricas com microrganismos imobilizados.

Após a obtenção das micropartículas com as culturas, iniciou-se os estudos de liberação de células das partículas. As populações de *B. animalis* liberadas das partículas após ensaios em tampões com diferentes valores de pH podem ser analisadas na Tabela 2 e na Figura 1. Observa-se que as partículas apresentaram um perfil de liberação controlada em relação ao tempo e ao pH do meio. As contagens obtidas após 180 minutos de dissolução das partículas mostraram que a maior população foi de 8,43 log UFC/g com as partículas secas a 110°C, e comparando esse resultado à concentração inicial de células viáveis adicionadas (9,41 log UFC/g), ocorreu perda celular de apenas um ciclo logarítmico de células. Por outro lado, com as secagens a 130°C e 160°C, as perdas foram de 2,45 e 4,13 ciclos logarítmicos, respectivamente, tornando a população de bifidobactérias relativamente baixa para uma possível aplicação em alimentos. Essa diminuição na população provavelmente ocorreu devido a permanência das bactérias em temperaturas do ar de saída do equipamento mais altas, durante o período de secagem. Em relação ao pH do meio de dissolução, para o valor de pH 4,5, obteve-se as contagens mais baixas que variaram de 2,02 a 4,24 log UFC/g em todos os tempos testados. Isso significa que praticamente não houve liberação ou dissolução das partículas nesse meio, e essa contagem provavelmente ocorre devido às células que estão na superfície das partículas e que podem se desprender a qualquer momento. No tampão pH 6,0, observa-se que os valores de contagens foram intermediários permanecendo entre 5,04 e 7,98 Log UFC/g. Provavelmente nesse meio a dissolução das partículas não foi completa. Finalmente, com o tampão pH 7,5, obteve-se as contagens mais altas, chegando a 8,43 log UFC/g com as partículas secas a 110°C. Todavia, o aspecto mais relevante desses resultados é a diferença na liberação entre as soluções com pH 4,5, 6,0 e 7,5, pois considerando quase todos os resultados, as contagens obtidas nesses valores de pH em função do tempo de liberação, apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$). Esse perfil de liberação mostra que essas partículas possuem potencial para aplicação em alimentos com pH abaixo de 4,5, e também para uma possível liberação controlada no intestino.

Para *Lactobacillus acidophilus* LA-5 encapsulados em formulação padrão, os testes de dissolução demonstraram que ocorreu comportamento similar ao *B. animalis* encapsulado nas mesmas condições. Em pH 4,5, ocorreu liberação máxima de 5,31 Log UFC/g após 180 minutos de dissolução (Tabela 3 e Figura 2). No tampão pH 6,0, as populações obtidas foram de 7,86 e 8,36 Log UFC/g após 120 e 180 min de reação, sendo superiores às populações obtidas com a liberação em tampão 4,5, mas estatisticamente iguais aos valores obtidos com pH 7,5, que foram 7,88 e 8,23 Log UFC/g nos mesmos intervalos de tempos.

Tabela 2. Populações de *B. animalis* (log UFC/g) nas partículas (formulação padrão) obtidas em diferentes temperaturas de secagem e tratadas com soluções pH 4,5, 6,0 e 7,5.

Tempo (min)	110°C			130°C			160°C		
	pH 4,5	pH 6,0	pH 7,5	pH 4,5	pH 6,0	pH 7,5	pH 4,5	pH 6,0	pH 7,5
60	2,05 ^g	6,99 ^c	6,11 ^d	2,02 ^e	5,05 ^b	6,87 ^a	2,12 ^g	5,04 ^{b,c,d}	3,36 ^f
120	3,04 ^f	6,99 ^c	7,29 ^c	3,15 ^d	5,18 ^b	6,94 ^a	3,12 ^f	5,23 ^{a,d}	5,26 ^{a,d}
180	4,24 ^e	7,98 ^b	8,43 ^a	4,16 ^c	5,14 ^b	6,96 ^a	4,13 ^e	5,55 ^a	5,28 ^{a,b}

Obs.: Para cada valor de temperatura, valores relacionados com letras iguais não são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

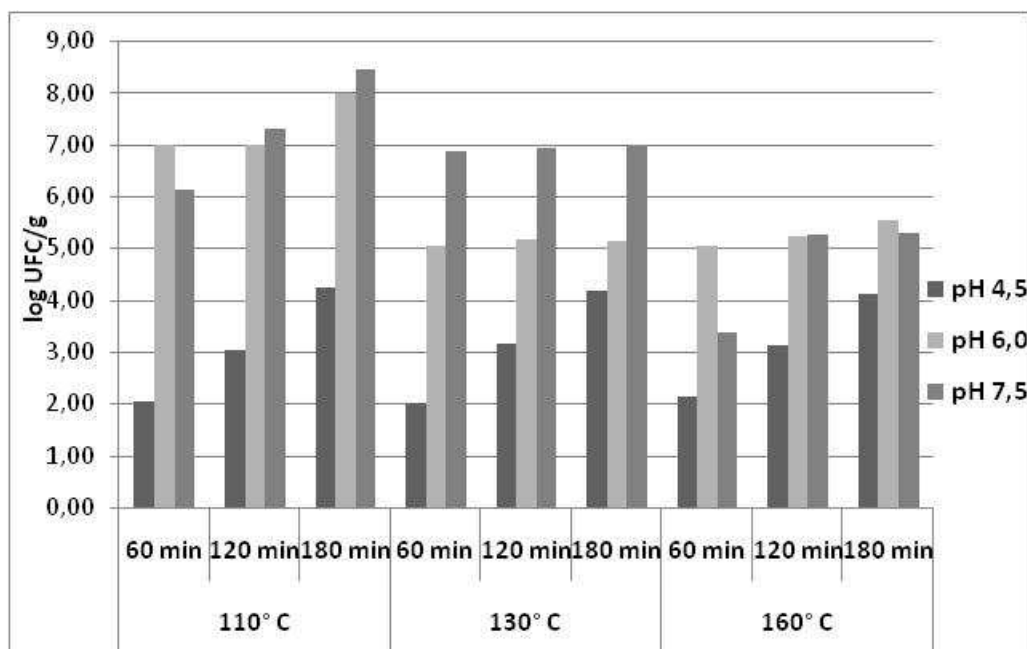


Figura 3. Populações de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB12) liberadas das partículas com formulação padrão após 60, 120 e 180 min em tampões pH 4,5, 6,0 e 7,5.

Tabela 3. Populações de *L. acidophilus* LA-5 (log UFC/g) em partículas (FP) obtidas com secagem a 110°C e tratadas com soluções pH 4,5, 6,0 e 7,5.

Tempo (min)	pH 4,5	pH 6,0	pH 7,5
60	4,04 ^e	7,86 ^c	7,88 ^{b,c}
120	4,20 ^e	8,25 ^a	8,19 ^{a,c}
180	5,31 ^d	8,36 ^a	8,23 ^{a,b}

Obs.: Valores relacionados com letras iguais não são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

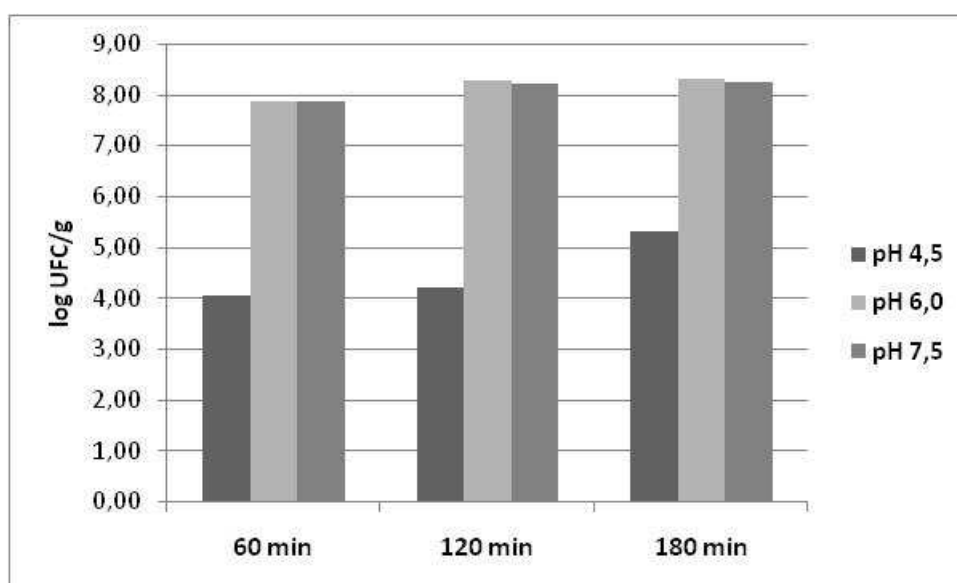


Figura 2. Populações de *L. acidophilus* LA-5 liberadas das partículas com formulação padrão após 60, 120 e 180 min em tampões pH 4,5, 6,0 e 7,5.

CONCLUSÃO

Conclui-se a produção de micropartículas com acetato ftalato celulose e inulina para imobilização de bactérias probióticas é tecnologicamente viável com a utilização da técnica de secagem em *spray dryer*. As partículas obtidas por esta metodologia apresentaram um perfil de liberação controlada em função do pH, o que as torna insolúveis em valores de pH menores que 4,5. Esse perfil de liberação controlada pode ser considerado como um avanço tecnológico para a futura aplicação dessas partículas em alimentos com pH ácido como, por exemplo, sucos e leites fermentados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARVANITOYANNIS, I.S.; HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, M.V. Functional foods: a survey of health, claims, pros and cons, and current legislation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.45, p. 385-404, 2005.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. Córdoba, 2001. 34p.
Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso em: 03 fev. 2005. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation]
- GIBSON, R.G.. Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* v. 18 p. 287-298, 2004.
- JACKSON, L.S.; LEE, K. Microencapsulation of *Lactococcus lactis* within cross-linked gelatin membranes. *Journal Chemistry Technology Biotechnology*, v.56, p. 259-63, 1993.
- KAILASAPATHY, K. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, v.3, p.39-48, 2002.
- ROBERFROID, M.B. Prebiotics: the concept revisited. *J. Nutr.*, v.137, p.830S-837S, 2007.
- SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *Int. Dairy J.*, v.8, p.341-347, 1998.
- SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. *Nutr. Rev.*, v.61, p.91-99, 2003.
- SANTOS, A.B., FERREIRA, V.P., GROSSO, C.R.F. Microcápsulas – Uma alternativa viável. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, ano III, n.16, p26-30, 2000.
- SHAHIDI, F.; HAN, X.Q. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.33, n.6, p.501-547, 1993.
- WELLS, A.L.; SAULNIER, D.M.A.; GIBSON, G.R. Gastrointestinal microflora and interactions with gut flora. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B., (Eds.). *Handbook of prebiotics*. Boca Raton: CRC Press, p.14-38. 2008.