

## Microencapsulação de *Bifidobacterium animalis* em acetato ftalato celulose e avaliação de sua aplicação em néctar de acerola

GONÇALVES, L. S.<sup>1</sup>, MORENO, I.<sup>2</sup>, LISERRE, A. M.<sup>3</sup>, ANTUNES, A. E. C.<sup>4</sup>, NISIDA, A. L. A.  
C.<sup>5</sup>, CHINELLATO, N.A.<sup>6</sup>, MENDONÇA, J. B.<sup>6</sup>

Nº 11247

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de néctar de acerola simbiótico com a adição de células de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* microencapsuladas em acetato ftalato celulose pela técnica de secagem em *spray dryer*. Foram realizados 3 processamentos de néctar de acerola adicionados de inulina em escala semi industrial. O produto final foi estocado a  $5\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 35 dias e avaliado a cada 5 dias para os seguintes parâmetros: contagem do microrganismo probiótico *B. animalis*, contagem de microrganismos aeróbios psicotróficos, contagem de bolores e leveduras, pH, °Brix, acidez total titulável, viscosidade aparente e coloração instrumental. As características físico-químicas permaneceram estáveis durante o período de estocagem. A presença de bolores e leveduras e de microrganismos psicotróficos não foi observada. As amostras de néctar de acerola com células encapsuladas apresentaram contagens de *B. animalis* superiores a 8 log UFC/200mL por até 30 dias de estocagem, adequando-se à legislação brasileira de produtos funcionais. Por outro lado, as amostras contendo células livres de *B. animalis* apresentaram contagens de 5.94 log UFC/200mL após o mesmo período de armazenamento. Conclui-se que a encapsulação da cultura probiótica foi eficiente para aumentar a viabilidade da cultura em néctar de acerola estocado por 30 dias sob refrigeração.

Palavras-chave: néctar de acerola, probióticos, prebióticos, microencapsulação

---

1. BOLSISTA CNPq: Estagiário, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP, \* lincoln@fea.unicamp.br  
2. ORIENTADOR: Pesquisador, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP imoreno@ital.sp.gov.br  
3. COLABORADOR: Pesquisador, IAL, São Paulo-SP  
4. COLABORADOR: Pesquisador, FCA/UNICAMP, Limeira-SP  
5. COLABORADOR: Pesquisador, FRUTHOTEC/ITAL, Campinas-SP  
6. COLABORADOR: Estagiário, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP

## ABSTRACT

The aim of this study was to develop a symbiotic juice with addition of inulin and probiotic bacteria microencapsulated in acetate phthalate by the spray-drying technique. A total of 3 processing runs were conducted for production of acerola nectar added with prebiotics and free or microencapsulated probiotic culture. The final products were stored at  $5\pm 2^{\circ}\text{C}$  for 35 days and evaluated every 5 days for the following parameters: counts of *B. animalis*, counts of aerobic psychrotrophic microorganisms, counts of moulds and yeasts, pH, soluble solids, titrable acidity, instrumental color and apparent viscosity. The physico-chemical characteristics of the samples remained stable throughout storage. The presence of psychotropic microorganisms, molds and yeasts was not observed. At 30 days storage the acerola juice samples containing microencapsulated probiotic microorganisms exhibited counts greater than 8 log cfu/200mL (a portion of juice = 200mL), which falls within the limits set forth by Brazilian legislation for functional foods. On the other hand, the samples containing free cells of *B. animalis* showed counts of 5.94 log cfu/200mL after the same time of storage. It can be concluded that microencapsulation is a suitable technique for improving the viability of probiotic microorganisms in acerola juice throughout 30 days of cold storage.

Key-words: acerola juice, probiotic, prebiotic, microencapsulation

## INTRODUÇÃO

Dentre os diversos alimentos funcionais disponíveis no mercado, os probióticos têm papel de destaque, em especial em produtos lácteos. No entanto, outras matrizes alimentares precisam ser avaliadas como carreadoras de bioculturas, para propiciar ao mercado outras opções alimentares, especialmente para consumidores que não apreciam ou não podem consumir derivados do leite.

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro, porém podem apresentar pouca estabilidade em produtos extremamente ácidos. Muitas propostas tecnológicas e soluções inovadoras têm sido investigadas para resolver os problemas de estabilidade e viabilidade em novos desenvolvimentos de alimentos. Nesse contexto, novas formulações e tecnologias de microencapsulação têm aumentado a resistência dos microrganismos com resultados promissores (MATTILA-

SANDHOLM *et al.*, 2002). A microencapsulação pode ser utilizada para a proteção de células microbianas em alimentos e durante a passagem pelo trato gastrointestinal.

A aplicação de culturas probióticas em sucos é incipiente, existindo poucos estudos publicados na literatura. A sobrevivência das culturas em sucos de frutas pode variar em função do sabor e das culturas escolhidas. O presente trabalho objetivou o desenvolvimento de microcápsulas com probióticos (*B. animalis* subsp. *lactis* Bb12) e a avaliação de sua aplicação e viabilidade em néctar de acerola simbiótico durante a estocagem.

## OBJETIVOS

- Desenvolver microcápsulas contendo culturas probióticas (*L. acidophilus* LA-5 ou *B. animalis* subsp. *Lactis* Bb12) e avaliar sua aplicação em suco de fruta simbiótico.
- Avaliar a sobrevivência de bactérias probióticas encapsuladas em suco de fruta simbiótico durante a estocagem.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a encapsulação foi utilizada a cultura *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12. Essa cultura foi reativada por aproximadamente 20 horas a 37°C em leite desnatado reconstituído (10%) e suplementado com 1% de glicose e 1% de extrato de levedura. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 4677g por 10 minutos a 4°C, lavadas por duas vezes em solução salina 0,85%, e ressuspensas no material de recobrimento, a base de celulose acetato ftalato, Hi-maize, maltodextrina, Tween 80, glicerol, trealose e leite reconstituído. Essa suspensão foi submetida a secagem em Mini Spray Dryer (Büchi B-290), sendo a temperatura do ar de entrada regulada em 110°C.

Como matéria-prima para a bebida foi empregada polpa de acerola (De Marchi®), sendo a mesma caracterizada quanto ao teor de sólidos solúveis e acidez total titulável (ATT) para definição das formulações do néctar. Os néctares foram formulados para resultar em produtos com relação Brix/ATT (ou Ratio) igual a 40, com a utilização de 30% de polpa. Adicionou-se inulina a 0,75% (1,5g por porção de 200 mL), açúcar refinado comercial e ácido cítrico. O processamento para obtenção das amostras constou de aquecimento e desaeração em tacho encamisado a vácuo com agitação (50°C, 450-500 mmHg, pressão manométrica), seguido de acondicionamento em garrafas de vidro de 300 ml, fechamento com tampas metálicas tipo twist-off, e

tratamento térmico em tanque aberto, com água em ebulição por 15 minutos. Após o resfriamento, em ambiente de assepsia, foram adicionadas nas garrafas as culturas de *B. animalis* na forma de micropartículas ou do controle como células livres liofilizadas tipo DVS (*Direct Vat Set*). Após o processamento os néctares foram armazenados em câmara sob temperatura de  $5 \pm 2^\circ\text{C}$ , sendo avaliados nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 dias.

Os sólidos solúveis, expressos em °Brix, foram determinados por meio de leitura direta em refratômetro (AOAC, 1992). O pH foi avaliado em potenciômetro digital B375 (Micronal) e a viscosidade em viscosímetro Brookfield, Modelo RVT, na temperatura de  $10^\circ\text{C}$ . As amostras foram analisadas quanto a cor CIELab pelo colorímetro portátil Konica Minolta CR400/410 CR-400. O sistema utilizado para leitura da cor foi o Cielab, Iluminante C.

Em relação às análises microbiológicas efetuou-se a contagem de *B. animalis* em ágar MRS-LP, de aeróbios psicotróficos em ágar PCA, e de bolores e leveduras em ágar DRBC. A incubação para as culturas probióticas foi realizada por 72h a  $37^\circ\text{C}$  em anaerobiose, para psicotróficos a  $7^\circ\text{C}$  por 10 dias e para fungos a  $25^\circ\text{C}$  por 4 dias (SILVA, 2007).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de néctar de acerola produzidas apresentaram características físico-químicas estáveis durante o período de estocagem. Independentemente do tratamento das amostras, o pH e a acidez titulável se mantiveram estáveis ao longo do armazenamento refrigerado (Tabela 1). O teor médio de sólidos solúveis das amostras foi de  $11,9^\circ\text{Brix}$ , com variação entre  $11,7$  e  $12,7^\circ\text{Brix}$ . Em relação à viscosidade aparente também não houve alterações significativas ao longo da vida de prateleira dos néctares, com variações entre 6 e  $10\text{cP}$ .

**Tabela 1.** Valores médios de pH e de acidez total titulável (%) nas amostras de néctar de acerola ao longo do armazenamento refrigerado ( $5 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

Tempo (dias)	pH			Acidez Titulável Total (%)		
	C <sup>1</sup>	L <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>	C <sup>1</sup>	L <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>
0	$3,46 \pm 0,02^{bAB}$	$3,45 \pm 0,03^{bB}$	$3,62 \pm 0,03^{aB}$	$0,28 \pm 0,02^{aA}$	$0,27 \pm 0,01^{aA}$	$0,28 \pm 0,01^{aA}$
5	$3,45 \pm 0,02^{bAB}$	$3,43 \pm 0,03^{bB}$	$3,60 \pm 0,04^{aB}$	$0,28 \pm 0,01^{aA}$	$0,28 \pm 0,02^{aA}$	$0,28 \pm 0,02^{aA}$
10	$3,43 \pm 0,02^{bAB}$	$3,43 \pm 0,02^{bB}$	$3,58 \pm 0,01^{aB}$	$0,29 \pm 0,01^{aA}$	$0,29 \pm 0,01^{aA}$	$0,29 \pm 0,01^{aA}$
15	$3,44 \pm 0,03^{bAB}$	$3,44 \pm 0,03^{bB}$	$3,60 \pm 0,02^{aB}$	$0,29 \pm 0,02^{aA}$	$0,29 \pm 0,02^{aA}$	$0,31 \pm 0,01^{aA}$
20	$3,41 \pm 0,02^{bC}$	$3,40 \pm 0,03^{bB}$	$3,56 \pm 0,01^{aB}$	$0,31 \pm 0,02^{aA}$	$0,29 \pm 0,01^{aA}$	$0,31 \pm 0,01^{aA}$
25	$3,71 \pm 0,04^{bA}$	$3,71 \pm 0,03^{bA}$	$3,83 \pm 0,03^{aA}$	$0,28 \pm 0,01^{aA}$	$0,28 \pm 0,01^{aA}$	$0,28 \pm 0,02^{aA}$
30	$3,49 \pm 0,04^{bB}$	$3,47 \pm 0,03^{bB}$	$3,62 \pm 0,02^{aB}$	$0,28 \pm 0,01^{aA}$	$0,28 \pm 0,01^{aA}$	$0,28 \pm 0,02^{aA}$

35	3,44±0,02 <sup>bAB</sup>	3,44±0,02 <sup>bB</sup>	3,60±0,02 <sup>aB</sup>	0,28±0,01 <sup>aA</sup>	0,29±0,02 <sup>aA</sup>	0,30±0,02 <sup>aA</sup>
----	--------------------------	-------------------------	-------------------------	-------------------------	-------------------------	-------------------------

Obs.: As amostras (média ± desvio padrão) seguidas de mesmas letras minúsculas na linha não diferem ao nível de 5%. As amostras (média ± desvio padrão) seguidas de mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem ao nível de 5%. 1 - Amostra controle (sem adição de *B. animalis*). 2 - Amostra com *B. animalis* na forma de células livres. 3 - Amostra com *B. animalis* microencapsulado (partículas)

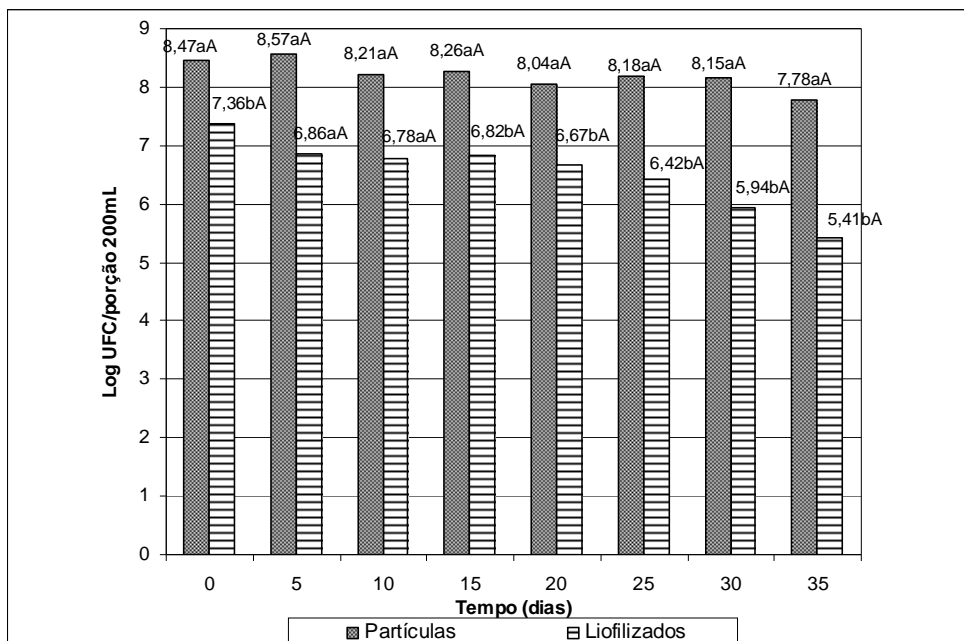
Observou-se que as amostras controle, com células livres e com células microencapsuladas apresentaram comportamento de cor semelhante, em termos de distanciamento da cor original (zero dias de armazenamento). Pode-se notar uma tendência de crescimento da diferença total de cor em todas as amostras a partir dos 25 dias de armazenamento (Tabela 2).

**Tabela 2.** Diferença total de cor das amostras de néctar de acerola adicionadas de probiótico na forma de células livres, microencapsulado (partículas) e controle (sem adição de probiótico) ao longo do tempo de armazenamento refrigerado ( $5 \pm 2^\circ\text{C}$ )

Tempo (dias)	C <sup>1</sup>	L <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>
5	0.24 ± 0.05 b B	0.51 ± 0.29 ab B	0.74 ± 0.14 a BC
10	0.41 ± 0.14 a B	0.38 ± 0.09 a B	0.43 ± 0.31 a C
15	0.83 ± 0.19 a AB	0.93 ± 0.12 a B	0.99 ± 0.26 a BC
20	0.71 ± 0.11 a AB	0.80 ± 0.16 a B	0.63 ± 0.35 a BC
25	0.60 ± 0.06 a AB	0.57 ± 0.10 a B	0.69 ± 0.07 a BC
30	1.36 ± 0.51 a AB	1.97 ± 0.64 a AB	1.69 ± 0.72 a B
35	2.20 ± 1.41 a A	2.93 ± 1.34 a A	2.89 ± 0.57 a A

Obs.: As amostras (média ± desvio padrão) seguidas de mesmas letras minúsculas na linha não diferem ao nível de 5%. As amostras (média ± desvio padrão) seguidas de mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem ao nível de 5%. 1 - Amostra controle (sem adição de *B. animalis*). 2 - *B. animalis* na forma de células livres. 3 - *B. animalis* microencapsulado (partículas)

A viabilidade da cultura probiótica nas amostras de néctar de acerola durante o armazenamento refrigerado pode ser observada na Figura 1. As amostras contendo a cultura probiótica *B. animalis* microencapsulada mantiveram contagens em torno de 8 log UFC por porção (de 200mL de suco) por 30 dias de armazenamento refrigerado. Essa contagem atende ao recomendado pela ANVISA para produtos com alegação de propriedades funcionais, que estabelece que a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo (BRASIL, 2008). A presença de bolores e leveduras e de microrganismos psicotróficos não foi observada.



**Figura 1:** Populações médias (log UFC/mL) de *B. animalis* na forma de células encapsuladas (partículas) e células livres (liofilizadas) em néctar de acerola adicionado de 1,5g de inulina por porção (200mL) durante a estocagem refrigerada ( $5\pm 2^\circ\text{C}$ ). **Obs.:** Os resultados seguidos de mesmas letras minúsculas não diferem ao nível de 5% em relação ao tratamento. Os resultados seguidos de mesmas letras maiúsculas não diferem ao nível de 5% em relação ao tempo.

Em todas as amostras foi adicionada uma quantidade da biocultura equivalente a  $10^6$  UFC/mL (o que corresponde a  $10^8$  UFC por porção de 200 mL de néctar de acerola). Ainda assim, não foi obtida contagem de 8 log UFC de *B. animalis* por porção quando a cultura foi adicionada na forma de células livres, pois a contagem inicial foi de 7,36 log UFC/200mL. Além disso, no trigésimo dia observou-se uma diminuição da sobrevivência da biocultura liofilizada em cerca de 1,4 log UFC por porção de néctar de acerola em relação ao primeiro dia de estocagem, quando a contagem chegou a 5,94 log UFC/200mL.

Aos 35 dias de armazenamento refrigerado do néctar a contagem de células viáveis da cultura probiótica microencapsulada diminuiu para 7,78 log UFC por porção, deixando de se adequar à legislação brasileira, com decréscimo de 0,7 ciclos logarítmicos em relação ao primeiro dia. Em relação às células liofilizadas o decréscimo aos 35 dias de armazenamento foi de 1,95 ciclos logarítmicos nas contagens também em relação ao primeiro dia.

A encapsulação da cultura probiótica foi, portanto, eficiente para aumentar a viabilidade da cultura em néctar de acerola que apresentou vida de prateleira de 30 dias, no que se refere à sua alegação funcional. Por esse motivo, as demais análises do produto foram finalizadas aos 30 dias de armazenamento.

No desenvolvimento de um produto probiótico diferentes linhagens de bioculturas devem ser avaliadas. A aplicação de culturas probióticas em sucos é incipiente, existindo poucos estudos publicados na literatura correlata.

Foi observada diminuição de cerca de 3 ciclos logarítmicos na contagem de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* após o armazenamento de sucos comerciais de frutas (laranja, uva e maracujá) adicionados desta cultura e armazenados a 4°C por seis semanas (Saarela, Virkärvi, Alakomi, Sigvart-Mattila, & Mättö, 2006). A contagem final dos probióticos nestes sucos foi de cerca de 4 log UFC.mL<sup>-1</sup>. A cultura empregada no trabalho citado é a mesma da presente pesquisa, tendo sido adicionada de crioprotetor, porém não microencapsulada.

Champagne e Gardner (2008) avaliaram a viabilidade de nove lactobacilos probióticos em suco de fruta estocado a 4°C por até 80 dias. Os resultados demonstraram grande variação entre as espécies e as linhagens.

Ding e Shah (2008) investigaram a sobrevivência de bactérias probióticas encapsuladas ou não em sucos de maçã e laranja usando oito diferentes linhagens. As culturas encapsuladas sobreviveram em sucos de frutas por até seis semanas de estocagem (>10<sup>5</sup> UFC/mL), enquanto as células livres perderam a viabilidade com cinco semanas.

## CONCLUSÃO

Conclui-se que a produção de néctar de frutas simbiótico adicionado da cultura *B. animalis* microencapsulada em acetato ftalato celulose por secagem em spray dryer é viável e que a microencapsulação da cultura probiótica melhorou sua viabilidade ao longo do armazenamento do produto por 30 dias a 5°C, em comparação à utilização de células livres liofilizadas.

## Agradecimentos:

Ao CNPq pela bolsa concedida e à FAPESP pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15. ed. Arlington, 1992.



BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. VIII - **Lista das Alegações Aprovadas**. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm>. Acesso em 15 mai. 2010.

CHAMPAGNE, C. P. & GARDNER, N. J. (2008). Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. *Food Research International*, 41, 539-543.

DING, W. K., & SHAH, N. P. (2008). Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juice. *International Food Research Journal*, 15 (2), 219-232.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. *Int. Dairy J., Amsterdam*, v.12, p.173-182, 2002.

SAARELA, M., VIRKAJÄRVI, I., ALAKOMI, H. –L., SIGVARTA-MATTILA, P., MÄTTÖ, J. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 1477-1482, 2006.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A., TANIWAK, N.H., SANTOS, R.F.S., GOMES, R.A.R., *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*, 3. Ed. São Paulo: Editora Varela, 2007.