



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

OTIMIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO DE MICROCÁPSULAS DE *Bifidobacterium animalis* subsp. *Bifidum* (BB-12) POR SPRAY DRYER

Danaê Fernanda Avanze **Cação**^{1a}; Izildinha **Moreno**^{1b}; Eliane Melo **Brolazo**^{1c}; Aline **Vieira**^{1c},
Renato Abeilar Romeiro **Gomes**^{1c}

¹Instituto de Tecnologia de Alimentos;

Nº 13247

RESUMO - O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos componentes Maltodextrina, Ftalato de Acetato de Celulose (CAP) e Trealose adicionados em uma mistura base de leite desnatado e água, na sobrevivência das células de *B. animalis* subsp. *bifidum* (BB-12), submetidas a um processo de microencapsulação utilizando secador do tipo *spray dryer*. Os resultados mostraram que apenas o leite desnatado foi suficiente para assegurar um rendimento satisfatório para todas as condições estudadas.

Palavras-chaves: *B. animalis* subsp. *bifidum* BB-12, microcápsulas, spray dryer.

^aBolsista CNPq: Graduação em 12/2014, danafac@gmail.com, ^bOrientador, ^c Colaborador



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

ABSTRACT- The aim of this study was to evaluate the effect of the components Maltodextrin, Cellulose Acetate Phthalate (CAP) and Trehalose, added to a basic mixture of skim milk and water, in the survival of cells of *B. animalis* subsp. *bifidum* (BB-12), subjected to microencapsulation process using spray dryer. The results showed that only skim milk was sufficient to ensure satisfactory encapsulation efficiency for all conditions studied.

Key-words: *B. animalis* subsp. *bifidum* BB-12, microcapsules, spray dryer

1. INTRODUÇÃO

A relação entre alimentos probióticos, promoção da saúde e bem-estar do organismo humano tem sido cada vez mais valorizada pelos consumidores. Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados nas quantidades adequadas, conferem benefícios ao hospedeiro (FAO/ WHO, 2001). A dose diária recomendada é de, no mínimo, 10^8 UFC.g⁻¹ (unidades formadoras de colônias por grama) de produto (BRASIL, 2011). Por isso, a sobrevivência do probiótico às condições adversas do trânsito gastrointestinal é um requisito fundamental para sua funcionalidade (Ding; Shah, 2009; de Vos *et al.*, 2010).

A microencapsulação é uma técnica de empacotamento de materiais sólidos ou líquidos em microcápsulas comestíveis, que variam de 1 µm a 1 mm. Os agentes usados na composição da formulação para microencapsulação devem ser compatíveis tanto com o probiótico quanto com o alimento carreador (Borgogna, 2009). A capacidade de liberação controlada das microcápsulas nas condições específicas do sítio-alvo também é propriedade desejável (Anal, A.; Singh H, 2009, de Vos *et al.*, 2010). A secagem por *spray dryer* é bastante utilizada na indústria de alimentos para microencapsulação de ingredientes, dentre outros produtos termolábeis (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Trabalhos anteriormente realizados no TECNOLAT/ITAL resultaram no desenvolvimento de uma formulação a base de acetato ftalato de celulose (CAP), agente bastante utilizado na indústria farmacêutica por sua capacidade de proteção entérica dos ativos e liberação controlada, pois é insolúvel em pH ácido e solúvel em pH neutro/alcalino, para microencapsulação de *B. animalis* subsp. *bifidum* (BB-12) pela técnica de *spray dryer*. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos componentes da solução encapsulante, por meio de delineamento experimental de modo a aumentar o rendimento e reduzir custos do processo de microencapsulação de *B. animalis* subsp. *bifidum* (BB-12) por secagem em *spray dryer*.



2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo e microencapsulação

O microrganismo *Bifidobacterium animalis* subsp. *bifidum* (BB-12) obtido na forma de um concentrado liofilizado, da Chr. Hansen's (Valinhos, SP). Um grama do concentrado liofilizado foi homogeneizado em 100 ml de leite desnatado 12% (Molico, Nestlé), suplementado com 2% de glicose e 1% de extrato de levedura (LDR 12%), autoclavado a 115°C por 12 minutos. O homogeneizado foi distribuído em frascos estéreis em porções de 10 ml. Os frascos foram fechados e armazenados a -18°C.

Antes de cada experimento de microencapsulação, uma alíquota do probiótico estocado foi descongelada e reativada em LDR 12%, para ser incorporado à solução encapsulante em sua forma ativa (células em crescimento exponencial). As soluções contendo o probiótico (proporção 1:10) foram submetidas à secagem em *spray dryer* (modelo Büchi-290). Os parâmetros operacionais do equipamento foram previamente ajustados e são os seguintes: bico pulverizador de 1,5 milímetros de diâmetro, temperatura de entrada de ar de 110°C, temperatura média de saída de ar de 70°C, fluxo de ar de 439 L/h. Logo após o processo de secagem, as micropartículas secas foram recolhidas em frascos estéreis e armazenadas em dessecador a $7 \pm 2^\circ\text{C}$.

A viabilidade do probiótico foi determinada por técnica de semeadura em profundidade em ágar MRS (*pour plate*). Um grama das micropartículas foi dissolvido em 9 mL de solução tampão fosfato pH 7,5, homogeneizado por 3 horas em *shaker* a 150 rpm a 37°C e então submetido à diluição seriada. As diluições decimais das amostras foram preparadas em água peptonada 0,1%, plaqueadas e incubadas em jarras para anaerobiose e envelope gerador de atmosfera anaeróbica por 72 horas à 37°C.

O rendimento em porcentagem (%RE) do processo foi calculado por meio da fórmula: $\%RE = (\log N / \log N_0) \times 100$. Onde: $\log N_0$ e $\log N$ são respectivamente o número logarítmico das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC.mL⁻¹) na formulação antes da secagem e por grama nas microcápsulas (UFC.g⁻¹) (Reddy, K.B.O. *et al*, 2009).

2.2. Delineamento estatístico para desenvolvimento dos experimentos

Um delineamento fatorial composto central rotacional $2^3 + 2.3p_a + 3p_c$, foi realizado para avaliar o efeito dos componentes CAP, Maltodextrina e Trealose em uma mistura base de água e



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

leite desnatado. O delineamento foi composto de 17 ensaios, com 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 3 pontos centrais. A concentração do leite desnatado foi mantida constante em 6% para garantir uma quantidade de material seco suficiente para a formação da solução encapsulante. As variáveis independentes Maltodextrina, CAP e Trealose foram avaliadas em três níveis equidistantes de variação e codificadas com -1,68, -1, 0, +1, +1,68. As variáveis resposta desta vez foram definidas como sendo o rendimento da encapsulação (%RE0), determinado logo depois do processo de secagem, o rendimento após exposição ao pH ácido, (%RE0 pH2), em que as micropartículas foram homogeneizadas em uma solução ácida com pH 2,0 logo após a secagem, e a porcentagem de rendimento após 21 dias de armazenamento a $7 \pm 2^\circ\text{C}$ (%RE21). A Tabela 1 mostra os valores das variáveis relacionados aos níveis codificados, sendo os pontos axiais representados por -1,68 e +1,68 respectivamente.

Tabela 1 Valores das variáveis relacionados aos níveis codificados utilizados na matriz do delineamento fatorial composto central rotacional $2^3 + 2.3pa + 3pc$.

Fator (variável independente)	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Maltodextrina (%)	0,5	1,1	2,0	2,9	3,5
CAP (%)	1,5	2,7	4,5	6,3	7,5
Trealose (%)	0,5	1,1	2,0	2,9	3,5

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta a matriz do delineamento fatorial composto central rotacional $2^3 + 2.3pa + 3pc$ com valores codificados dos níveis de Maltodextrina, CAP e Trealose e das variáveis respostas obtidas para o rendimento da microencapsulação logo após o processo (RE0), após tratamento em solução pH 2,0 (RepH2) e após 21 dias de armazenamento $7 \pm 2^\circ\text{C}$ (RE21). As estimativas dos efeitos das variáveis Maltodextrina, CAP e Trealose sobre a variável resposta RE0 (resultados não mostrados) indicaram que além da média, os termos quadráticos das variáveis CAP e Trealose, e os termos relativos à interação linear de CAP e Trealose foram estatisticamente significativos. Contudo, os efeitos desses componentes foram negativos, o que indica que a presença de ambos isoladamente ou combinados interferem de modo a reduzir o rendimento da microencapsulação logo após a secagem.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Tabela 2 Média dos resultados experimentais dos rendimentos das microcápsulas RE0, RE0pH 2 e RE21 delineamento fatorial composto central rotacional $2^3 + 2.3pa + 3pc$.

Ensaio	Variáveis dependentes (g/ 100 mL)			Variáveis resposta		
	Maltodextrina	CAP	Trealose	RE0 (%)	RE0 pH 2 (%)	RE21 (%)
1	1,1	2,7	1,1	58,09	69,91	82,05
2	2,9	2,7	1,1	54,32	73,68	78,61
3	1,1	6,3	1,1	54,32	67,13	76,78
4	2,9	6,3	1,1	85,9	90,51	76,68
5	1,1	2,7	2,9	85,24	98,41	87,17
6	2,9	2,7	2,9	74,25	80,24	86,7
7	1,1	6,3	2,9	72,29	63,85	82,83
8	2,9	6,3	2,9	64,37	54,5	99,18
9	0,5	4,5	2	79,39	87,1	99,39
10	3,5	4,5	2	87,71	93,37	97,93
11	2	1,5	2	76,37	93,62	100
12	2	7,5	2	64,83	76,19	100
13	2	4,5	0,5	67,17	80,88	92,88
14	2	4,5	3,5	65,37	71,41	93,93
15 (C)	2	4,5	2	91,59	95,45	89,93
16 (C)	2	4,5	2	89,84	94,86	92,59
17 (C)	2	4,5	2	96,85	100	79,27

(*) RE0 = Eficiência da encapsulação logo depois do processo de secagem; RE0 pH2 = Eficiência da microencapsulação após tratamento em pH 2,0 logo depois do processo de secagem; RE21 = Eficiência da microencapsulação após 21 dias de armazenamento a $7 \pm 2^\circ\text{C}$.

As estimativas dos efeitos das variáveis Maltodextrina, CAP e Trealose sobre a variável resposta RE0 pH2 (resultados não mostrados) indicaram que além da média, os termos linear e quadrático da variável CAP, o termo quadrático da variável Trealose, e os termos relativos às interações entre Maltodextrina e Trealose, e também entre CAP e Trealose, foram todos estatisticamente significativos. Mais uma vez os efeitos nesses casos citados foram negativos, indicando que nenhuma das variáveis estudadas favoreceu o rendimento da microencapsulação após tratamento em solução ácida. Do mesmo modo, as estimativas dos efeitos das variáveis



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Maltodextrina, CAP e Trealose sobre a variável resposta RE21 (resultados não mostrados) indicaram que além da média, nenhum outro termo foi estatisticamente significativo.

A partir dos resultados das análises, pode-se considerar que a formulação utilizando apenas leite em pó desnatado, pode oferecer melhores resultados de rendimento em relação a outras formulações que utilizaram Maltodextrina, CAP e/ou Trealose nas faixas de concentração estudadas.

Para validação desses resultados, as microcápsulas probióticas foram preparadas com leite desnatado reconstituído na faixa de 4 a 10%. Para 10% obteve-se rendimentos de 99,48% (RE0) e 99,87% (RE0 pH2).

4. CONCLUSÃO

Os componentes Maltodextrina, CAP e Trealose tiveram efeito negativo no rendimento da encapsulação. Uma solução de leite desnatado na concentração de 10% em água é suficiente para promover a microencapsulação do probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *bifidum* BB-12 pelo processo de secagem em *spray dryer*, podendo apresentar rendimentos superiores a 99%, em meio neutro e ácido, logo após o processo.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida ao primeiro autor através do Programa Institucional de Bolsas CNPq/PIBIC e ao TecnoLat / ITAL pela oportunidade de estágio.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAL, A., SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends Food Science**. v. 18, p. 96-103, 2009.

BORGOGNA, M.; BELLICH, B.; ZORZIN, L.; LAPASIN, R.; CESÀRO, A. Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterization of non-conventional gelling system. **Food Chemistry**. v. 122, p. 416-423, 2009.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos alimentos/ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. **VII – Lista das Alegações Aprovadas**. Brasília, 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm>. Acesso em 10 de jan.2011.

de VOS, P., FAAS, M.M., SPASOJEVIC, M., SIKKEMA, J. **Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components**. v. 20, p. 292-302, 2010.

DING, W.K., SHAH, N.P. An Improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. **Journal of Food Science**. v.74, p. 53–61, 2009.

FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Basel, Switzerland: World Health Organization, 2001.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**.40, 1107-1121, 2007.

REDDY, KBOK; MADHU, NA, PRAPULLA, SG. Comparative survival and evaluation of functional probiotic properties of spray-dried lactic acid bacteria. **International Journal of Dairy Technology**. V. 62, n2, p.240-248, 2009.