

RESISTÊNCIA *IN VITRO* DE *Lactiplantibacillus plantarum* LIVRE E MICROENCAPSULADO POR COACERVAÇÃO COMPLEXA

Nataly de Almeida Costa¹, Ester de Paula Amaral¹, Laura Rodrigues Silveira¹, Gabriel Clementino Pereira¹, Daniele de Almeida Paula², Maria José do Amaral e Paiva¹, Érica Nascif Rufino Vieira¹, Afonso Mota Ramos¹

¹Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil (nataly.almeida20@gmail.com)

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná, Campus Assis Chateaubriand, PR, Brasil.

RESUMO: Durante o desenvolvimento de alimentos probióticos, etapas como a formulação, o processamento e o armazenamento podem influenciar na sobrevivência desses microrganismos. Uma alternativa para minimizar esses danos é a técnica de microencapsulação que consiste em uma estratégia para melhorar a proteção física e a estabilidade dos probióticos nos alimentos. O objetivo deste estudo foi microencapsular células probióticas de *Lactiplantibacillus plantarum* através da técnica de coacervação complexa utilizando gelatina e goma arábica e avaliar a resistência durante a simulação *in vitro* das condições gastrointestinais. Inicialmente, foi realizado o cultivo de probiótico *Lactiplantibacillus plantarum* LP299V® em caldo MRS. As microcápsulas foram produzidas utilizando 2,5% de gelatina e 2,5% de goma arábica e, e seguida, foram avaliadas quanto a eficiência da encapsulação (EE%) e sobrevivência do probiótico durante a passagem pelo sistema gastrointestinal *in vitro*. A viabilidade das células encapsuladas de *L. plantarum* foi de 7,7 Log UFC·g⁻¹ e a eficiência de encapsulamento foi de 94%. Após a simulação *in vitro* das condições gastrointestinais, a viabilidade das células livres apresentou redução de, aproximadamente, 5 Log UFC·g⁻¹ enquanto a célula microencapsulada apresentou redução de, aproximadamente, 1 Log UFC·g⁻¹. Tais resultados confirmam a eficiência da técnica de coacervação complexa para proteger microrganismos probióticos e garantir sua viabilidade quando submetido às condições adversas. Com isso, a indústria de alimentos pode utilizar a microencapsulação como uma estratégia para estabilizar os compostos sensíveis adicionados durante as etapas de processamento, sendo uma forma de agregar valor aos seus produtos e se diferenciar no mercado.

PALAVRAS-CHAVE: Coacervados; probiótico; viabilidade; fase gástrica

1 INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento de alimentos probióticos, etapas do processamento, armazenamento, a matriz utilizada e a passagem pelo sistema gastrointestinal humano são fatores que afetam a viabilidade desses microrganismos. Uma vez que o alimento é consumido, as etapas e os efeitos gerados durante a passagem pelo sistema gastrointestinal são levados em consideração, devido a acidez do estômago, a presença de sais biliares e das enzimas digestivas que afetam a estabilidade dos probióticos que, consequentemente, deixam de promover os efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (Ester et al., 2019).

A técnica de microencapsulação vem sendo amplamente utilizada com a finalidade de estabilizar

compostos sensíveis e pode ser um sistema transportador adequado para aumentar a capacidade dos probióticos de sobreviver sob condições extremas, como baixo pH e a presença de enzimas (Eratte et al., 2018). A microencapsulação é uma tecnologia de inclusão de ingredientes sensíveis em várias matrizes, uma vez que os ingredientes são presos ou completamente cercados pelas matrizes protetoras (De Prisco; Mauriello, 2016).

Dentre as técnicas de microencapsulação, a coacervação complexa consiste em um fenômeno de separação de fase líquido-líquido que ocorre quando biopolímeros carregados eletrostaticamente opostos, como proteínas e polissacarídeos, são reunidos sob certas condições específicas como pH, força iônica,

concentração de polímeros e temperatura que são responsáveis por influenciar o processo (Eratte et al., 2018). Essa técnica vem sendo indicada para microencapsulação de probióticos devido as brandas condições necessárias para formação das microcápsulas já que o processo não utiliza temperaturas elevadas.

O presente estudo teve como objetivo desenvolver microcápsulas contendo *Lactiplantibacillus plantarum* pela técnica de coacervação complexa e avaliar a resistência dessas microcápsulas durante a passagem pelo sistema gastrointestinal *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

- Estirpe de *Lactobacillus* e condições de crescimento

Como microrganismo probiótico, foi utilizado a cultura de *Lactiplantibacillus plantarum* LP299V® (JamiesonTM Natural Sources). A cultura liofilizada foi cultivada de acordo com Paula et al. (2019) com modificações. A cultura de probiótico foi cultivada por duas vezes em caldo Man Rogosa e Sharp (MRS) e incubada a 37 °C por 48 h. Posteriormente, o sistema foi centrifugado a 5000 rpm por 10 min. O crescimento celular foi observado até atingir a fase estacionária, seguido de centrifugação e remoção do sobrenadante. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células probióticas foi ressuspensos por duas vezes em uma solução salina estéril (0,85%), seguida por centrifugação 5000 rpm por 10 minutos.

- Microencapsulação de *L. plantarum* por coacervação complexa

A produção das microcápsulas foi realizada conforme metodologia descrita por Silva et al. (2018), com modificações. Foi adicionado 1g da cultura de microrganismos probióticos em 100 mL de gelatina (Gelita, 2,5 %), mantendo-se sob constante agitação a 48 °C durante 10 minutos para homogeneização. Em seguida, foram adicionados 100 mL de goma arábica (Synth, 2,5 %) a 25 °C e 400 mL de água destilada estéril, sob agitação e aquecimento (50 ± 2 °C), ajustando o pH para 4,0 com solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 mmol/L. A solução foi resfriada naturalmente até atingir a temperatura de 30 °C e, em seguida, imersa em banho de gelo até atingir 12-10 °C. Posteriormente, a solução foi filtrada com auxílio de papel filtro para retirada do precipitado que foi armazenado em frasco estéril a temperatura de 8 °C.

- Viabilidade e eficiência da encapsulação (EE%)

Um grama de microcápsulas produzidas foi reconstituído em 9 ml de solução salina (0,85%), obtendo-se a diluição 10⁻¹. A suspensão foi mantida durante 5 minutos a 25 °C sob agitação em um agitador vórtex (KASVI® basic K45-2810) para liberar as células probióticas (Arslan et al., 2015). Em seguida, a viabilidade foi estabelecida por meio de

contagem de bactérias láticas, de acordo com Richter; Vedamuthu (2001) utilizando meio de cultura MRS adicionado de púrpura de bromocrezol e carbonato de cálcio antes e após o processo de microencapsulação. A eficiência de encapsulamento (EE) é definida como a taxa de sobrevivência do microrganismo durante o processo, calculada de acordo com a Eq. (1), como descrito por Annan; Borza; Hansen, (2008):

$$EE (\%) = \frac{N}{No} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

Em que:

N: número de células viáveis (Log UFC.g⁻¹) liberadas das micropartículas;

No: número de células viáveis (Log UFC.g⁻¹) na célula concentrada antes da microencapsulação.

- Morfologia das microcápsulas probióticas

Foi realizada a microscopia (Olympus BX-60) com aumento de 40x para visualizar a microestrutura das microcápsulas produzidas.

- Sobrevida de *L. plantarum* nas microcápsulas quando submetido às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*

A simulação *in vitro* das condições gastrointestinais foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Bedani, Rossi e Saad (2013). Foram pesadas 10 g de microcápsulas e diluídas em 90 mL de solução de NaCl 0,85 % sendo denominada como a diluição 10⁻¹. Como primeira etapa do estudo *in vitro*, foi simulada a fase gástrica. Para tanto, 10 mL da diluição anterior (10⁻¹) foram colocados em 3 frascos erlenmeyers de 125 mL, onde foram adicionados 3 g/L de pepsina e 0,9 mg/L de lipase, respectivamente. O pH foi ajustado para 2,3 - 2,6 com HCl 1N, procedendo a um período de incubação de 2 h a 37 °C sob agitação de 150 rpm em shaker.

Passado o período de incubação, teve início a simulação do intestino delgado, em que o pH foi ajustado para 5,4 - 5,7. Para tal ajuste de pH, foi utilizado solução de fosfato de sódio pH 12 (150 mL de NaOH 1N; 14 g de NaH₂PO₄. 2H₂O, completa 1L com água destilada) contendo bile e pancreatina, na proporção de 5 g/L e 1,6 g/L, respectivamente, havendo novo período de incubação, nas mesmas condições citadas anteriormente.

Após 4 horas do início do teste *in vitro*, foi simulado o intestino grosso e o pH foi ajustado para 6,8 - 7,2 utilizando solução de fosfato de sódio pH 12 contendo bile (7,95 g/L) e pancreatina (0,79 g/L). Um terceiro período de incubação nas mesmas condições foi realizado, totalizando 6 horas de ensaio.

Ao final de cada ciclo de incubação (2, 4 e 6 horas), os quais correspondem às simulações da fase gástrica,

entérica I e entérica II, alíquotas de 1 mL foram retiradas para as diluições decimais com a finalidade de verificar a viabilidade do probiótico. As alíquotas foram plaqueadas em profundidade (“pour plate”) em Ágar MRS adicionado de púrpura de bromocrezol e carbonato cálcio e incubadas a 37 °C por 72 horas em condições de anaerobiose. O resultado da contagem em placa foi expresso em Log UFC·g⁻¹.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

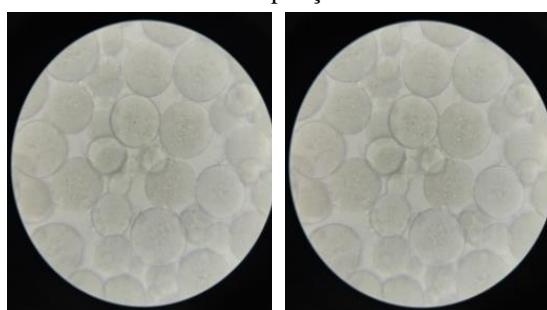
- Viabilidade e eficiência da encapsulação (EE%)

A viabilidade das células de *L. plantarum* microencapsuladas pelo processo de coacervação complexa usando gelatina e goma arábica (pH = 4,0) foi de $7,7 \pm 1,3$ Log UFC·g⁻¹, representando uma eficiência de encapsulamento de 94%. Silva et al. (2018) obtiveram uma eficiência de encapsulamento de 86% utilizando a técnica de coacervação complexa para microencapsulação de *Bifidobacterium lactis*. A técnica de microencapsulação por coacervação é uma tecnologia altamente promissora, pois consiste em um processo simples e de baixo custo e geralmente obtém uma alta eficiência de encapsulamento e permite a liberação controlada do material dos probióticos presentes no núcleo, que pode ser desencadeado através de estresse mecânico, mudanças de temperatura ou variações de pH (Paula et al., 2019).

- Morfologia das microcápsulas probióticas

As microcápsulas (Figura 1) eram irregulares, multinucleadas e apresentavam tamanhos diferentes. O núcleo foi encapsulado pelo material da parede, proporcionando maior proteção às células probióticas. Os resultados do presente estudo indicam que a morfologia dos coacervados é fortemente dependente do pH, bem como do tipo e concentração dos biopolímeros escolhidos para serem usados como materiais de parede.

Figura 1. Imagens de microscopia das microcápsulas obtidas em ampliações de 40x.

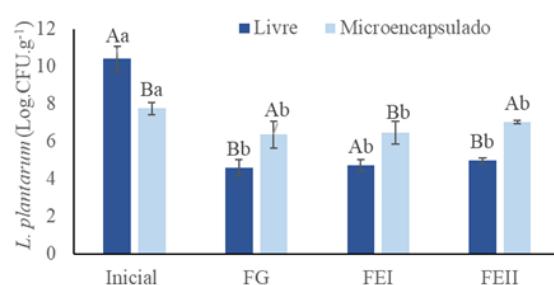


- Sobrevida de *L. plantarum* nas microcápsulas quando submetido às condições gastrointestinais simuladas in vitro

A sobrevida dos microrganismos probióticos em condições gastrointestinais é fundamental para garantir a entrega desses microrganismos no local de ação e a sobrevida em quantidades suficientes para promover benefícios à saúde. As microcápsulas produzidas foram submetidas a simulação gastrointestinal *in vitro* e a viabilidade do probiótico microencapsulado e da célula livre foram calculados e representados graficamente.

O ensaio *in vitro* foi realizado simulando três fases (gástrica, entérica I e entérica II), e os resultados, em termos de sobrevida de *L. plantarum* livre e microencapsulado, estão representados na Figura 2. Uma redução significativa ($p<0,05$) na viabilidade celular de ambos os tratamentos foi observada após a fase gástrica. Para as células encapsuladas a viabilidade teve uma redução de $1,39$ Log UFC·g⁻¹, enquanto a viabilidade da célula livre apresentou uma redução de $5,81$ Log UFC·g⁻¹.

Figura 2 - Sobrevida de *L. plantarum* livre e microencapsulado durante a simulação gastrointestinal *in vitro*. *Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$) entre as amostras na mesma fase. Diferentes letras minúsculas indicam diferença significativa ($p<0,05$) ao longo da simulação do TGI para cada amostra.



Nas fases entérica I e II, que simulam o intestino delgado e grosso, respectivamente, a viabilidade da cultura probiótica não diferiu ($p > 0,05$) da viabilidade da fase gástrica após períodos de incubação de 4 e 6 h, respectivamente. Nessas condições de pH ($pH>5$), ambos as microcápsulas formadas devido a interações atrativas entre gelatina e goma arábica podem ser rompidas. Isso ocorre pois os biopolímeros apresentam cargas elétricas predominantemente negativas, favorecendo a repulsão entre eles e consequente ruptura da estrutura da microcápsula e liberação do conteúdo probiótico.

Os materiais de parede à base de proteína como a gelatina possuem menos grupos polares do que os polissacarídeos, e essa característica contribui para

manter o efeito ácido fora do núcleo da micropartícula (Arslan et al., 2015).

4 CONCLUSÃO

A técnica de coacervação complexa foi capaz de produzir microcápsulas com características adequadas para aplicação em alimentos, pois apresentaram alta eficiência para o encapsulamento de *Lactiplantibacillus plantarum* e alta viabilidade celular após simulação *in vitro* das condições gastrointestinais. Resultados apresentados neste trabalho para microencapsular células de *L. plantarum* é uma abordagem útil e promissora para encapsulamento deste microrganismo, representando assim uma nova alternativa a ser aplicada no desenvolvimento de alimentos probióticos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

REFERÊNCIAS

- ANNAN, N. T.; BORZA, A. D.; HANSEN, L. T. Encapsulation in alginate-coated gelatina microspheres improves survival the probiotic *Bifidobacterium adolescentes* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. **Food Research International**, v. 41, p. 184-193, 2008.
- BEDANI, R.; ROSSI, E. A.; ISAY SAAD, S. M. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 382-389, 2013.
- DE PRISCO, A.; MAURIELLO, G. Probiotication of Foods: A focus on microencapsulation tool. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 27-39, 2016.
- ERATTE, D.; DOWLING, K.; BARROW, C. J.; ADHIKARI, B. Recent advances in the microencapsulation of Omega-3 Oil and probiotic bacteria through complex coacervation: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 121-131, 2018.
- ESTER, B.; NOELIA, B.; LAURA, C. J.; FRANCESCA, P.; CRISTINA, B.; ROSALBA, L. Probiotic survival and *in vitro* digestion of *L. salivarius* spp. *salivarius* encapsulated by high homogenization pressures and incorporated into a fruit matrix. **LWT - Food Science and Technology**, v. 111, p. 883-888, 2019.
- PAULA, D. A.; MARTINS, E. M. F.; COSTA, N. A.; DE OLIVEIRA, P. M.; OLIVEIRA, E. B.; RAMOS, A. M. Use of gelatin and gum arabic for microencapsulation of probiotic cells from *Lactobacillus plantarum* by a dual process combining double emulsification followed by complex coacervation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 722-731, 2019.
- RICHTER, R. L.; VEDAMUTHU, E. R. Milk and milk products. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, v. 4, p. 483-505, 2001.
- SILVA, T. M.; LOPES, E. J.; CODEVILLA, C. F.; CICHOSKI, A. J.; DE MORAES FLORES, É. M.; MOTTA, M. H.; DA SILVA, C. B.; GROSSO, C. R. F.; DE MENEZES, C. R. Development and characterization of microcapsules containing *Bifidobacterium* Bb-12 produced by complex coacervation followed by freeze Drying. **LWT - Food Science and Technology**, 90, 412-417, 2018.