

## AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS DE UMA BACTÉRIA ÁCIDO LÁTICA PRODUTORA DE SUBSTÂNCIA ANTIMICROBIANA ISOLADA DE QUEIJO FATIADO

CRISTIANO TAVARES VIEIRA<sup>1</sup>; CARLA POHL SEHN<sup>2</sup>; GRACIELE DAIANA FUNCK<sup>2</sup>; MAIARA LINDEMANN ZEHETMEYR<sup>2</sup>; VLADIMIR PADILHA DA SILVA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas – cristianotavaresvieira@gmail.com*

<sup>2</sup>*Universidade Federal do Pampa – carla.pohlsehn@gmail.com*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Pelotas – gracifunck@yahoo.com.br*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Pelotas – maiara.lz@hotmail.com*

<sup>3</sup>*Universidade Federal de Pelotas – vladimir.padilha2011@gmail.com*

### 1. INTRODUÇÃO

Probióticos são micro-organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, podem conferir benefícios à saúde do hospedeiro (SANDERS, 2003). Alguns dos benefícios são sobre a microbiota intestinal humana e incluem fatores como efeitos antagônicos e, competição com outros micro-organismos e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos. Outros benefícios incluem ainda, estimulação de células imunomodulatórias, redução da atividade de enzimas que ativam a carcinogênese e inibição do crescimento ou apoptose de células tumorais. (PARVEZ et al., 2006, VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Algumas características são necessárias para que um micro-organismo seja considerado probiótico, entre elas destacam-se a tolerância ao baixo pH do suco gástrico, a inocuidade, a resistência à ação da bile e das secreções pancreáticas e intestinais. Além disso, não pode transportar genes transmissores de resistência aos antibióticos, deve resistir à ação de fagocitose e sobreviver em baixa concentração de oxigênio (JERONYMO, 2013).

Os micro-organismos mais comumente utilizados como probióticos são as bactérias ácido lácticas (BAL), embora outras bactérias e certas leveduras também possam ser usadas (DIDARI et al., 2014). Entre as principais substâncias produzidas por BAL com capacidade antimicrobiana, estão o ácido lático, peróxido de hidrogênio, CO<sub>2</sub>, diacetil e as bacteriocinas, as quais podem ser utilizadas em substituição a antimicrobianos sintéticos. (ORTOLANI, 2009).

Considerando o exposto, a pesquisa por novas BAL probióticas é importante, a fim de satisfazer a demanda crescente do mercado por alimentos seguros e que conferem benefícios ao organismo. Deste modo, o objetivo do estudo foi avaliar características probióticas de uma BAL produtora de substância antimicrobiana isolada a partir de queijo fatiado comercializado em supermercados e mini-mercados na cidade de Pelotas/RS (SEHN et al., 2015).

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS

##### 2.1.1 TOLERÂNCIA ÀS CONDIÇÕES ÁCIDAS E SAIS BILIARES

Cultivo de 24h de uma BAL produtora de substância antimicrobiana identificada como LC254, a uma concentração final entre 10<sup>6</sup> e 10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> foi inoculado (1% v/v) em caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) com pH modificado (2,0 e 2,5) e caldo MRS adicionado de 0,3% de bile bovina (Sigma), seguido de incubação a 37°C, sob anaerobiose, por 4h, juntamente com controles em pH 6,5.

A sobrevivência sob as diferentes condições foi avaliada por contagem em placas de Petri, contendo ágar MRS, com limite de detecção de 1,7 log<sub>10</sub> UFC.mL<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>. As contagens foram realizadas no tempo 0 (zero) e 4h de incubação (PERELMUTER et al., 2008).

### **2.1.2 RESISTÊNCIA AO TRÂNSITO GÁSTRICO DE FORMA SIMULADA**

Cultivo de 24 h a 37°C do isolado LC254 foi centrifugado a 7.000 x g por 10 min, a 4°C. O pellet obtido foi lavado duas vezes com Tampão Fosfato Salino (PBS), com posterior ressuspensão em solução salina a 0,5%. Uma alíquota de 200 µL da suspensão celular foi misturada a 300 µL de solução salina e 1 mL de suco gástrico simulado, e incubada a 37°C. O suco gástrico simulado consistiu de pepsina (Sigma), na concentração de 3 mg.mL<sup>-1</sup>, com pH 2,5. A influência da presença de um alimento na sobrevivência do isolado durante o trânsito gástrico em pH 2,5, foi avaliada substituindo a solução salina por 300 µL de leite integral reconstituído a 10% (m/v). A sobrevivência em ambas as condições foi avaliada por contagem em placas de Petri, contendo ágar MRS, nos tempos 0 (zero), 15, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos (Huang e Adams, 2004).

### **2.1.3 CAPACIDADE DE AUTOAGREGAÇÃO E COAGREGAÇÃO**

As suspensões celulares do isolado LC254 e de *L. monocytogenes* ATCC Scott A (micro-organismo indicador) foram obtidas a partir do cultivo em caldo MRS e Caldo Brain Heart Infusion (BHI), respectivamente, conforme descrito no item anterior, e a absorbância (600nm) ajustada a 0,25 ± 0,02 (Collado et al., 2008).

A autoagregação foi determinada a partir da leitura da absorbância (600 nm) das suspensões celulares no tempo zero e após 2h, 20h e 24h de incubação 37°C. Para determinar a capacidade de coagregação, suspensões celulares do isolado LC254 e *L. monocytogenes* ATCC Scott A foram preparadas conforme descrito acima, incubadas a 37°C isoladamente (controles) e, em igual proporção do isolado e do patógeno (1:1). A leitura da absorbância (600 nm) foi realizada em 2h, 20h e 24h de incubação.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 TOLERÂNCIA ÀS CONDIÇÕES ÁCIDAS E SAIS BILIARES**

O isolado LC254 não resistiu ao baixo pH (2,0 e 2,5) nos tempos zero e quatro horas, porém, resistiu a presença de sais biliares nos dois tempo observados. É importante ressaltar que após a ingestão do alimento, o pH estomacal, que inicialmente variava entre 1,2 e 2,0, passa para 3,0 ou até 4,0, dependendo do alimento ingerido. No caso de iogurtes, o pH do estômago pode chegar a 5,0 (REDONDO, 2008), condições essas que podem ser, mais favoráveis à multiplicação do isolado LC254.

### **3.2 RESISTÊNCIA AO TRÂNSITO GÁSTRICO DE FORMA SIMULADA**

LC254 não foi capaz de sobreviver ao suco gástrico (pH 2,5 + 3 mg.mL<sup>-1</sup> de pepsina) já nos primeiros minutos do ensaio, conforme pode-se observar na Tabela 1. No entanto, manteve-se viável quando na presença de alimento (leite) em todos os tempos avaliados (0 a 240 min), sendo possível observar, inclusive, um aumento no número de células aos 240 min.

Tabela 1. Sobrevida do isolado LC254 após simulação *in vitro* do trato gástrico.

Tempo (min)	Suspensão celular		Suspensão celular + alimento	
	Log UFC.mL <sup>-1</sup>	% Sobrevida	Log UFC.mL <sup>-1</sup>	% Sobrevida
0	6,38	100	6,57	102,95
15	N.D.*	0	6,78	106,24
30	N.D.	0	5,88	92,08
60	N.D.	0	6,29	98,62
120	N.D.	0	6,27	98,26
180	N.D.	0	6,09	95,45
240	N.D.	0	6,49	101,74

\*N.D. = Não detectado (< 1 Log UFC.mL<sup>-1</sup>)

A presença de alimento parece conferir proteção ao isolado LC254. Resultado semelhante já foi observado por Silva et al. (2015), que avaliaram a viabilidade de isolados de BAL e de *L. monocytogenes* em suspensão e em queijo durante a passagem no trato gastrointestinal, e verificaram que o queijo (utilizado como veículo de transporte para a entrega dos micro-organismos) melhorou a sobrevida de todos os isolados de BAL testados.

### 3.2 CAPACIDADE DE AUTOAGREGAÇÃO E COAGREGAÇÃO

O percentual de autoagregação de LC254 foi de 17,2%, 50,8% e 56,4% em 2h, 20h e 24h respectivamente, enquanto *L. monocytogenes*, apresentou um percentual de 20,8%, 60,8% e 55% nestes mesmos períodos de tempo. Da mesma forma, foi observado um aumento do percentual de coagregação ao longo do tempo (16,6%, 25,8% e 74,8% em, 2h, 20h e 24h, respectivamente).

Jeronymo-Ceneviva et al. (2014), avaliaram a capacidade de autoagregação e coagregação de isolados de *Leuconostoc citreum* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, a 37°C. Os autores observaram um percentual de autoagregação maior que 40% para *L. citreum* e menor que 30% para *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. A coagregação com uma linhagem de *L. monocytogenes* gerou percentuais maiores que 40% para *L. citreum* e menores que 30% para *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

A agregação bacteriana entre linhagens da mesma espécie (autoagregação) e entre linhagens de diferentes espécies (coagregação) é considerada importante em muitos nichos, especialmente no intestino humano, onde os probióticos são bioativos. A autoagregação parece ser necessária para a adesão de linhagens probióticas às células epiteliais e a habilidade de coagregação pode formar uma barreira para prevenir a colonização por patógenos (COLLADO et al., 2008).

### 4. CONCLUSÕES

O presente estudo pode concluir que o isolado LC254 apresenta algumas características probióticas, no entanto, a realização de mais testes *in vitro* e *in vivo* são necessários a fim de investigar o potencial probiótico do isolado. No entanto, verificou-se que em presença de alimento houve proteção do isolado LC254, permitindo sua sobrevida e mesmo multiplicação em condições similares aquelas encontradas no trato gástrico.

### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COLLADO, M.C., MERILUOTO, J. & SALMINEN, S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*. Germany, v.226. p.1065–1073, 2008.

- DEL RE, B., SGORBATI, B., MIGLIOLI, M. & PALENZONA, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. **Letters in Applied Microbiology**. England, n.31. p.438–442, 2000.
- DIDARI, T. SOLKI, S. MOZAFFARI, S. NIKFAR, S. ABDOLLAHI, M. A systematic review of the safety of probiotics. **Expert Opinion on Drug Safety**, London, n.13, p. 227–239, 2014
- HERMANN, G. **Potencial bacteriocinogênico e probiótico de bactérias ácido láticas isoladas de leite e queijos artesanais**. 2013. 100p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria.
- HUANG, Y. & ADAMS, M.C. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v.91. p.253–260, 2004.
- JERONYMO, A. B. O. **Avaliação do potencial probiótico de bactérias acidoláticas produtoras de substância antimicrobiana isoladas de mussarela de búfala**. 2013. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.
- JERONYMO-CENEVIVA, A.B., DE PAULA, A.T., SILVA, L.F., TODOROV, S.D., FRANCO, B.D.G.M. & PENNA, A.L.B. Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Water-Buffalo Mozzarella Cheese. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**. United States v. 6, n.3-4, p.141–156, 2014.
- ORTOLANI, M. B. T. **Bactérias ácido-láticas autóctones de leite cru e queijo minas frescal: Isolamento de culturas bacteriocinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular**. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- PARVEZ, S.; MALIK, K. A.; KANG, S.; KIM, H. Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Jornal of Applied Microbiology**. Oxford v.100, p.1171-1185, 2006
- PERELMUTER, K.; FRAGA, M.; ZUNINO, P. In vitro activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.104, p.1718- 1725, 2008.
- REDONDO, N.C. **Avaliação in vitro de características probióticas do *Enterococcus faecium CRL183* e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416**. 2008. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutr. Rev**, United States, v.61, n.3, p.91-99, 2003.
- SEHN, C.P.; HAUBERT, L.; ZEHETMEYR, M.L.; IGLESIAS, M.A.; SILVA, W.P. Bactérias ácido láticas de queijos fatiados comercializados em Pelotas-RS: isolamento e caracterização de perfil antagonista e bacteriocinogênico. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo. v. 29, nº 242/243, 2015.
- SILVA, C.C.G., DOMINGOS-LOPES, M.F.P., MAGALHÃES, A. F., FREITAS, D. A. S.R., COELHO, M.C., ROSA, H.J.D. & DAPKEVICIUS, M.L.N.E. Short communication: Latin-style fresh cheese enhances lactic acid bacteria survival but not *Listeria monocytogenes* resistance under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Dairy Science**. United States, v.98 p 4377–4383, 2015.
- VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics from Metchnikoff to bioactives. **Internacional Dairy Jornal**, Netherlands, v.18, p.714-728, 2008.