

ATIVIDADE PROBIÓTICA *IN VITRO* DE *LACTOBACILLUS CASEI* 049 ISOLADO A PARTIR DA SILAGEM DE COLOSTRO BOVINO

CAROLINA LITCHINA BRASIL¹; JULIA VALENTE²; JULIANA MARQUES³; MARA SAALFELD⁴; FABIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁵; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA⁶.

¹*Universidade Federal de Pelotas 1 – carolinalitchinabrasil@hotmail.com* 1

²*Universidade Federal de Pelotas – juliaassilveira@gmail.com* 2

³*Universidade Federal de Pelotas – ju_marques@hotmail.com* 3

³*Universidade Federal de Pelotas – mara.saalfeld@gmail.com* 4

³*Universidade Federal de Pelotas fabio@leivasleite.com.br* 5

³*Universidade Federal de Pelotas – danielabrayer@gmail.com* 6

1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos que integram o grupo dos probióticos incluem as bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus*, que apresentam como principal característica a produção de ácido láctico (BRASIL, 2002).

As bactérias ácido lácticas (BAL) apresentam características morfológicas, metabólicas e fisiológicas similares. Ao serem empregadas na preparação de alimentos, esses micro-organismos proporcionam a redução do pH pelo consumo de carboidratos e produção de ácidos, o que consequentemente, aumenta o tempo de conservação do alimento, pois inibe a proliferação de micro-organismos deteriorantes e patogênicos (PFEILER; KLAENHAMMER, 2007). Presentes em uma grande variedade de alimentos, como leites e seus derivados, as BAL sobrevivem e multiplicam-se devido a disponibilidade de nutrientes que permitem manter o metabolismo dessas bactérias.

Os mecanismos de ação dos probióticos incluem fatores que aprimoram as defesas naturais do organismo, como a alteração da microbiota intestinal, fortalecimento e modificação da barreira intestinal, produção de compostos com atividades microbianas, inibição da adesão de patógenos e modulação da resposta imune. Apesar de pesquisas sinalizarem que a estimulação do sistema imune por probióticos pode ocorrer envolvendo a imunidade inata e adquirida e suas associações, os mecanismos de ação ainda não estão completamente esclarecidos (GODDEN, 2009).

Entre os lácteos, o colostro bovino, considerado a primeira secreção láctea por ocasião do parto, é expelido durante os primeiros sete dias pós-parto e tem como função a alimentação do bovino recém-nascido, pois fornece além da nutrição adequada, proteção imunológica (GODDEN, 2009).

Em virtude do excesso produzido e visando a conservação por períodos mais longos, SAALFELD (2008) desenvolveu a silagem de colostro bovino. Produzida a partir da fermentação do colostro pela microbiota natural do alimento, durante o período de 21 dias, o processo de silagem permite seu armazenamento prolongado, mantendo as características físicas e químicas encontradas no colostro *in natura*. Em estudo realizado por SAALFELD et al (2013), foi identificada a presença do gênero *Lactobacillus* spp. na silagem de colostro bovino, porém não há pesquisas relatando o potencial probiótico desses isolados.

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a atividade probiótica do *Lactobacillus casei* 049 isolado a partir da silagem de colostro bovino.

2. METODOLOGIA

L. casei 049, oriundo da silagem de colostro bovino, foi cedido da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia e Micologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). O isolado foi cultivado em agar Man, Rogosa and Sharpe (MRS), em anaerobiose/, 48 horas/ 37 °C. Para avaliar a capacidade probiótica do isolado realizaram-se os seguintes testes *in vitro*:tolerância aos ácidos e diferentes concentrações de sais biliares e avaliação da atividade antagonista frente a patógenos.

Sobrevivência a condições ácidas e sais biliares

O teste de sobrevivência do isolado foi avaliada em caldo MRS (pH 6,5) ajustado a pH 2 e 2,5 com ácido clorídrico (HCl) concentrado e a pH 2,5 acrescidos de pepsina (3mg/mL). A avaliação da tolerância bacteriana aos sais biliares foi realizada em caldo MRS suplementado com bile bovina a 0,3% e 1,0%. Culturas de 24 horas do *L. casei*, com concentração final entre 10^6 e 10^7 UFC/mL⁻¹, foram inoculadas nos caldos e incubados a 37°C/4 horas.

A sobrevivência sob diferentes condições foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), com limite de detecção de 1,7 log UFC/mL⁻¹. Ambas as avaliações seguiram o protocolo de PERELMUTER et al. (2008). Os resultados para os testes, foram avaliados pela contagem das células viáveis no tempo inicial e após 4 horas de incubação a 37°C.

A avaliação da sobrevivência seguiu os parâmetros descritos por CHARTERIS et al. (1997) que considera micro-organismo tolerante ao teste de sobrevivência à simulação gástrica (resistência às condições ácidas), aquele que diminui, no máximo, em 30% a sua concentração celular e, para o ensaio de sobrevivência ao trânsito intestinal (resistência aos sais biliares), aquele que apresenta uma redução de até 1,5 log da sua contagem inicial.

Determinação da atividade antagonista frente a micro-organismos patogênicos

A atividade antagonista foi realizada frente a linhagens de referência de *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028). Para os testes, *L. casei* 049 foi cultivado em caldo MRS a 37°C por 18 – 24horas, em anaerobiose.

O teste de antagonismo e a leitura dos halos de inibição foram realizados de acordo com o teste da gota (*spot on-the-lawn*) proposto por FLEMING et al. (1975). Como controles positivo e negativo foram utilizados *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Dy 13 e água destilada esterilizada, respectivamente. Alíquotas de 2 µL do cultivo em caldo MRS foram inoculadas na superfície de placas contendo ágar MRS e incubadas em jarras de anaerobiose a 37°C/24horas. As concentrações dos inóculos dos patógenos foram ajustadas na escala 3 de McFarland (9.10^8 UFC/mL⁻¹). Posteriormente, foram diluídas até a concentração de 10^5 UFC/mL⁻¹ e então foram inoculadas em ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) semi-sólido, o qual foi adicionado na superfície do agar MRS como uma sobrecamada. Para finalizar a técnica, as placas foram incubadas a 36°C/24h.

A atividade antagonista foi avaliada pela formação de halos inibitórios ao redor da colônia de cada isolado. O diâmetro dos halos foi medido com o auxílio de paquímetro digital 200 MM-8", sendo a medida de inibição calculada pela diferença entre os diâmetros do halo de inibição frente ao patógeno menos o diâmetro do crescimento do isolado testado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As BAL são utilizadas há muito tempo em alimentos como uma forma de conservação natural. Através de seu metabolismo transformam os carboidratos em ácido lático. Porém, outros peptídeos antimicrobianos são produzidos por BAL. Estas substâncias são responsáveis por inibir diversos micro-organismos deteriorantes e patogênicos. A pesquisa por BAL advinda da silagem de colostro bovino, que produzam substâncias potencialmente antimicrobianas é de fundamental importância para aplicação, viabilidade e eficácia da técnica de fermentação anaeróbica do colostro.

Cerca de 2,5 litros de suco gástrico com pH de aproximadamente 2,0 é secretado diariamente no estômago, o que causa a destruição de muitos micro-organismos, já que a maioria é sensível a valores de pH abaixo de 3,0. Normalmente, os alimentos permanecem no estômago entre 2 a 4 horas, entretanto, a digestão de líquidos no estômago é mais rápida que a dos sólidos, levando apenas 20 minutos. Neste sentido, a resistência ao trânsito gástrico humano é um importante critério de seleção para micro-organismos probióticos (REINHEIMER, 2003; HUANG; ADAMS, 2004;).

O isolado de *L. casei* 049 apresentou sobrevivência superior a 70% e redução inferior a 1,5 log em relação a população inicial quando submetidos a condições adversas de pH (2,0; 2,5; 2,5 + pepsina) e sais biliares (0,3% e 1%) o que vem de encontro com outros estudos, nos quais linhagens de *Lactobacillus* foram capazes de reter sua viabilidade a valores de pH entre 2,0 e 2,5 (HWANHLEM et al., 2010; MEIRA, et al., 2012). A sobrevivência do isolado frente as condições testadas é fundamental, visto que o suco gástrico secretado pelo estômago é capaz de inviabilizar diversos micro-organismos, bem como os sais biliares podem alterar a estrutura das membranas celulares, sendo tóxicos para as células bacterianas (OH e JUNG, 2015).

O isolado, quando submetido ao teste de antagonismo, demonstrou atividade antimicrobiana frente a todos os patógenos testados, apresentando halos de inibição de 15,5, 18, 19 e 23,5 frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhimurium*, respectivamente.

NERO et al. (2008) verificaram o potencial antagônico de 360 colônias de BAL isoladas de leite cru e observaram que as bactérias mostraram atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* e *Salmonella Enteritidis*. Os autores sugerem que alimentos com altas populações microbianas nativas interferem diretamente no crescimento e desenvolvimento de patógenos. MEIRA et al. (2010) avaliaram seis isolados de BAL obtidos de leite e queijo e evidenciaram atividade antagonista contra *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*.

Os resultados encontrados no presente estudo são importantes, visto que o isolado apresentou atividade antagonista contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sugerindo potencial contra patógenos entéricos, como os que responsáveis por desencadearem gastroenterites (UYMAZ et al., 2009).

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o isolado *L. casei* 049 apresenta características probióticas *in vitro*, quando submetido aos testes de sobrevivência a condições ácidas e sais biliares, bem como apresentou atividade antagonista frente a patógenos. Todavia, outros testes são necessários para comprovar a atividade probiótica deste micro-organismo. A partir dos resultados preliminares obtidos

têm-se como perspectivas seguir investigando e difundindo a utilização da silagem de colostro bovino.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 2, de 7 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 9 de janeiro de 2002.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. **International Journal of Food Microbiology**, 35: 1-27, 1997.

GODDEN, S. Microbial risks associated with feeding colostrum to calves. **Annu Mtg Southwest Nutrition and Management Conference**, p.26-27, 2009.

PERELMUTER, K.; FRAGA, M.; ZUNINO, P. In vitro activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1718- 1725, 2008.

PFEILER EA; AZCARATE-PERIL MA; KLAENHAMMER TR. Chacacterization of a novel bile-inducible operon encoding a two-component regulatory system in *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 13, p. 4624-34. 2007.

SAALFELD, M. H. Uso da Silagem de colostro como substituto do leite na alimentação. **A Hora Veterinária**, Ano 27, n. 162, p. 59-62, 2008.

SAALFELD, M. H. et al. Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves **Ciência Rural**, 2013.

FLEMING, H. P., ETCHELLS, J. L., COSTILOW, R. N. (1975). Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. **Applied microbiology**, v. 30, n. 6, p. 1040-1042.