

CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS COM POTENCIAL PROBIÓTICO ISOLADAS DE PRODUTOS LÁCTEOS

MARINA SCUMANN PERELLÓ¹; JULIA NEITZEL UECKER²; ITIANE BARCELLOS JASKULSKI³; PAMELA DOS SANTOS HELLWIG⁴; SIMONE PIENIZ⁵.

¹*Universidade Federal de Pelotas – marinaperello.rs@hotmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – julia_uecker@hotmail.com*

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

⁴*Universidade Federal de Pelotas – pml.1991@hotmail.com*

⁵*Universidade Federal de Pelotas – nutrisimone@yahoo.com.br*

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define probióticos como “micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo” (FAO/WHO, 2001). A quantidade mínima viável para que um alimento seja considerado probiótico deve estar em uma faixa diária de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) no produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia (ANVISA, 2008).

Os principais benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos a ingestão de culturas probióticas podem ser resumidos em: controle e estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos; diminuição da população de patógenos por meio da produção de ácidos acéticos e lático; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose; estimulação do sistema imune; alívio da constipação; aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas (SAAD, 2006; BADARÓ et al., 2008). A viabilidade do probiótico no alimento depende de fatores como temperatura de estocagem, nível de oxigênio, pH, atividade de água, presença de inibidores e micro-organismos competitivos (GRANATO et al., 2010).

As bactérias probióticas oriundas de alimentos devem primeiramente sobreviver durante a passagem ao trato gastrointestinal, para então, persistirem no intestino e promover efeitos benéficos ao hospedeiro. Desta forma, o isolamento e caracterização probiótica torna-se relevante, pois sabe-se que nem todos os micro-organismos contidos em um determinado alimento possuem potencial probiótico. Assim, este estudo teve por objetivo analisar a capacidade probiótica de isolados de bactérias ácido-lácticas oriundos de produtos derivados lácteos como kefir e alimentos lácteos como, ricota e queijo minas frescal.

2. METODOLOGIA

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Microbiologia e Nutrifisiogenômica da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), localizados na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Utilizou-se neste estudo cinco micro-organismos isolados de produtos como kefir (K1 e k2), ricota (R1) e queijo minas frescal (F3 e F4). Estes micro-organismos estão mantidos em cultura estoque a -18°C no Laboratório de Nutrifisiogenômica da UFPEL.

A resistência dos isolados sob diferentes condições ácidas foi avaliada em caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (pH6,5) usados como controle e os tratamentos ajustados a pH 2, 3 e 4 com ácido clorídrico (HCL) concentrado.

A avaliação da tolerância aos sais biliares foi realizada em caldo MRS suplementado com uma mistura de colato de sódio e deoxicólico de sódio na proporção de 1:1 atingindo concentrações finais de 0,1%, 0,3%, 0,5% e 1% (m/v). Culturas de 24h com concentração final entre 10^6 e 10^7 UFCmL $^{-1}$ foram inoculadas nos tratamentos e incubadas a 35°C por 4h, juntamente com controles em pH6,5 e sem adição de sais biliares. A sobrevivência sob diferentes condições foi avaliada por contagem em placas com limite de detecção de 1,7 log UF mL $^{-1}$. Ambas as avaliações seguiram o protocolo de Perelmutter et al. (2008).

A avaliação de tolerância ao trânsito gastrointestinal superior foi realizada conforme HUANG e ADAMS (2004). As células bacterianas com 24h de incubação foram separadas por centrifugação (12.000 xg por 5min a 4°C), lavadas duas vezes com tampão fosfato e ressuspensas em solução salina a 0,5%. Uma alíquota de 0,2% da suspensão celular foi ministrada a 0,3mL de solução salina e 1,0mL de sucos gástrico ou intestinal simulados e incubados a 36°C. A contagem de células viáveis foi realizada no tempo inicial (0h) e nos tempos de 2h e 4h para a tolerância gástrica e tolerância ao trânsito no intestino delgado. O suco gástrico simulado consistiu em pepsina (3mg/mL) e pH2 com ou sem a adição de leite; enquanto o suco intestinal simulado foi composto por pancreatina (1mg/mL), pH8 com ou sem adição de 0,5% de sais biliares. O efeito da presença de um alimento na sobrevivência durante o trânsito gástrico em pH2 foi avaliado da mesma forma, porém, substituindo a solução salina por 0,3mL de leite integral reconstituído a 10% (m/v).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bactérias ácido lácticas isoladas no presente estudo foram identificadas molecularmente por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA e depositadas no GenBank como: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (KF879126); *Lactococcus lactis* (KF879126); *Streptococcus parauberis* (NR_043001); *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (KF879126) e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (KJ531392).

A análise de tolerância aos ácidos, constatou-se que o isolado R1 obteve crescimento somente nos tratamentos pH 3 nos tempos 0, 2 e 4h, com valores de log de $8,30 \pm 0,00$; $7,72 \pm 0,01$; $7,10 \pm 0,02$, respectivamente; e no pH 4 houve crescimento em todos os tempos. Quando analisado os isolados de queijo minas frescal, observou-se que o isolado F3 não teve crescimento em nenhum pH avaliado e, o isolado F4 apenas no tempo 0h, no pH3 ($7,23 \pm 0,16$) e no pH4 ($7,12 \pm 0,39$). Na análise dos micro-organismo isolados de kefir, os isolados K1e K2 apresentaram crescimento em todos os pH analisados em todos os tempos. Em estudo realizado por MEIRA (2011), as bactérias ácido lácticas quando expostas a diferentes condições ácidas não obtiveram diferenças significativas entre o controle e o tratamento no pH4; quando analisadas no pH3 as bactérias foram resistentes após 4h; já no pH2 a contagem bacteriana esteve abaixo do limite de detecção após este período.

Quanto à tolerância aos sais biliares no presente estudo observou-se na concentração de 0,1% de sais biliares em todos os tempos analisados que os micro-organismos R1, K1 e K2 apresentaram crescimento semelhante, maior ou menor em relação ao controle. Ao analisar os micro-organismos F3 e F4 foi constatado crescimento somente no tempo 0h. Observou-se que o isolado K1 apresentou resultado menor que o controle em todos os tempos, na concentração

de 0,3%. Já, ao analisar o tratamento com 0,5% de sais biliares este micro-organismo (K1) apresentou crescimento menor em relação ao controle somente no tempo 0h. Na análise com concentração de 1,0% de sais biliares, apenas K1 obteve crescimento, porém apenas no tempo 0h. Segundo SHEHATA et al. (2016) a tolerância aos sais biliares é um pré-requisito para a colonização e atividade metabólica de bactérias no intestino delgado do hospedeiro. No presente estudo, os micro-organismos foram capazes de desenvolverem-se de maneira satisfatória na presença de 0,1% de sais biliares. De acordo com estudo realizado por TAVAKOLI et al. (2017), os isolados analisados apresentaram tolerância aos sais biliares sendo que oito isolados cresceram nas concentrações de 0,3 e 0,5%; seis isolados na concentração de 1,0% e três isolados apresentaram resistência quando adicionado 2,0% de sais biliares.

Na análise de tolerância ao suco gástrico simulado os tratamentos com pepsina pH2 e pepsina pH2 + leite integral nos tempos 0h e 2h, os micro-organismos R1, K1 e K2 apresentaram crescimento semelhante ou maior em relação ao controle. O micro-organismo F4 apresentou crescimento semelhante ou maior ao controle apenas no tratamento pepsina pH2. Já no tempo de 4h, os micro-organismos R1, K1 e K2 apresentaram crescimento semelhante ou maior em relação ao controle nos tratamentos com pepsina pH2 e pepsina pH2 + leite integral.

Referente a análise de tolerância ao suco intestinal simulado, no tempo 0h foi constatado que o isolado K2 apresentou crescimento maior no tratamento pancreatina pH8 e menor no tratamento pancreatina pH8 + 0,5% de sais biliares em relação ao controle. Quando analisados os micro-organismos F3 e K1 observou-se crescimento maior e semelhante ao controle, respectivamente, somente no tratamento pancreatina pH8. Ao analisar o micro-organismo R1 observou-se crescimento semelhante (pancreatina pH8) ou menor (pancreatina pH8 + 0,5% de sais biliares) comparado ao controle. O isolado F4 apresentou crescimento menor que o controle para ambos os tratamentos realizados. No tempo 2h foi observado que o isolado K2 apresentou crescimento maior no tratamento pancreatina pH8 e menor em pancreatina pH8 + 0,5% de sais biliares em relação ao controle. Já os micro-organismo R1 e K1 apresentaram resultado semelhante ao controle no tratamento pancreatina pH8. No tempo de 4h foi constatado que nenhum dos micro-organismos analisados apresentou crescimento no tratamento pancreatina pH8 + 0,5% de sais biliares. Ao analisar somente o tratamento pancreatina pH8 foi observado que os micro-organismos R1, F3, K1 e K2 apresentaram crescimento semelhante ou maior em relação ao controle.

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir de modo geral que, as bactérias ácido lácticas analisadas no presente estudo, exibiram características de grande importância na seleção de culturas com capacidade probiótica. Ressalta-se que este resultado é de suma importância, pois estes micro-organismos podem futuramente serem aplicados em alimentos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BADARÓ, A.C.; GUTTIERRES, A.P.; BEZENDE, A.C.; STRINGUETA, P.C. Alimentos probióticos: Aplicações como promotores da saúde humana- parte 1. **Revista Digital de Nutrição**, v.2, n.3, p.2-29, 2008.

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos.** 2008. Acessado em 28 mai. 2016. Online. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecnologia/lista_alega.htm.
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization - FAO/WHO. **Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria Córdoba.** Argentina, 2001. Acessado em 20 mai 2016. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf.
- GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; NAZZARO, F.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. **Comprehensive Reviews in Food Science Food Safety**, n.9, p.292-302, 2010.
- HUANG, Y.; ADAMS, M.C. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, n.91, p.253-260, 2004.
- KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciência Farmacêutica**, v.44, n.3, p.329-347, 2008.
- MEIRA, S.M.M. **Potencial Probiótico de bactérias lácticas e atividades biológicas de leite e queijos de ovelha.** Fevereiro de 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Programa de Pós graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal Pharmaceutical Science**, v.42, n.1, p.1-16, 2006.
- PERELMUTER, K.; FRAGA, M.; ZUNINO, P. *In vitro* activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, n.6, p.1718-1725, 2008.
- SHEHATA, M.G.; EL-SOHAIMY, S.A.; EL-SAHN, M.A.; YOUSSEF, M.M. Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. **Annals of Agricultural Sciences**, n.61, p.65-75, 2016.
- TAVAKOLI, M.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; HEJAZI, M.A.; AZIZI, M.H.; ABBASI, S. Characterization of Probiotic Abilities of *Lactobacilli* Isolated from Iranian Koozeh Traditional Cheese. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, n.67, p.41-48, 2017.