

## CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS COM POTENCIAL PROBIÓTICO ISOLADAS DE PRODUTOS LÁCTEOS

MARINA SCUMANN PERELLÓ<sup>1</sup>; JULIA NEITZEL UECKER<sup>2</sup>; ITIANE  
BARCELLOS JASKULSKI<sup>3</sup>; PAMELA DOS SANTOS HELLWIG<sup>4</sup>; SIMONE  
PIENIZ<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [marinaperello.rs@hotmail.com](mailto:marinaperello.rs@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [julia\\_uecker@hotmail.com](mailto:julia_uecker@hotmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [itianebarcellosj@hotmail.com](mailto:itianebarcellosj@hotmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [pml.1991@hotmail.com](mailto:pml.1991@hotmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [nutrisimone@yahoo.com.br](mailto: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 láctico; 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-láticas 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  $-18^{\circ}\text{C}$  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 deoxicolato 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>. 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 K1 e 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/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_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](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-SOHAIFY, 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.