

POTENCIAL ANTIOXIDANTE E CAPACIDADE ANTIMICROBIANA DE LINHAGENS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS ISOLADAS DE DERIVADOS LÁCTEOS

PAMELA DOS SANTOS HELLWIG¹; JULIA NEITZEL UECKER²; MARINA SCHUMANN PERELLÓ³; TIANE MARTIN DE MOURA⁴; SIMONE PIENIZ⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – pamela.hellwig@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – julia_uecker@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - marinaperello.rs@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – tianedemoura@gmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

A maioria dos probióticos pertencem ao grupo das bactérias ácido lácticas (BAL) as quais são produtoras de metabólitos secundários associados com efeitos de promoção da saúde estando amplamente distribuídas na natureza, principalmente nos laticínios. As BAL são habitantes dos tratos digestivo, respiratório superior e urogenital inferior de animais (MILLS, 2011).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada como recomendação diária na faixa entre 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) no produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante.

A atividade antimicrobiana é uma das formas empregadas pelas bactérias probióticas para excluir ou inibir a atividade de bactérias patogênicas no intestino. Entre os compostos antimicrobianos produzidos pelas BAL estão os ácidos orgânicos (ácido láctico e acético), peróxido de hidrogênio (onde o oxigênio está presente), diacetil, β -hidroxipropionaldeído (produzido por *Lactobacillus reuteri*), e compostos proteicos denominados bacteriostáticos ou bactericidas (FREIRE, 2012).

Evidências indicam que os probióticos podem ser úteis também como agentes antioxidantes, pois recentemente pesquisas vêm sendo conduzidas para comprovar tais propriedades das BAL *in vitro* e *in vivo*, sendo os *Lactobacillus*, um dos gêneros com capacidade probiótica, mais pesquisados. Sugere-se que os *Lactobacillus* possam melhorar a defesa antioxidante do hospedeiro, pois possuem sistemas para manter os radicais livres em níveis que não são tóxicos para as células (AHIRE et al. 2011).

Os micro-organismos considerados probióticos, devem exibir além das características básicas de sobrevivência no trato gastrointestinal, atividade antimicrobiana, sendo esta de suma importância na capacidade de inibição de bactérias patogênicas por culturas probióticas. Da mesma forma, a capacidade antioxidante pode ser expressa por diferentes métodos de avaliação, como pela inibição da peroxidação lipídica e capacidade de inibição de radicais livres. Desse modo, este estudo teve por objetivo determinar a atividade antimicrobiana e a capacidade antioxidante de BAL isoladas de produtos lácteos.

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. Os micro-organismos utilizados neste estudo foram isolados de produtos como kefir (K1 e K2) e alimentos lácteos como ricota (R1) e queijo minas frescal (F3 e F4). Como controle foi utilizada a cultura probiótica obtida do leite fermentado Yakult® (Y1 e Y2). Estes micro-

organismos estão mantidos em cultura estoque a -18°C no Laboratório de Nutrifisiogenômica da UFPEL.

Para a análise de atividade antimicrobiana foram realizados os testes de difusão em poços e difusão em disco de acordo com a metodologia descrita por BISCOLA et al. (2013) e TODOROV; DICKS (2004), respectivamente. A capacidade antioxidante foi realizada por meio da reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS) (OHKAWA et al. 1979) e capacidade antioxidante pelo método DPPH conforme metodologia descrita por BRAND-WILLIAMS et al. (1995), utilizando o sobrenadante bruto dos isolados.

Para os fatores de virulência foram realizados os testes de produção de lipase, perfil fermentativo, gelatinase, hemólise e DNase todos conforme metodologia descrita por BARBOSA et al. (2010); BANNERMAN (2003); MARRA et al. (2007); FOULQUIÉ MORENO (2003) e BANNERMAN (2003), respectivamente.

Os dados experimentais foram expressos como média ± desvio padrão e avaliados por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5% para comparação das médias, por meio do programa ASSISTAT (versão 7.7 beta).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana dos isolados foi testada frente aos micro-organismos indicadores *Escherichia coli* ATCC 8739, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076. Foram consideradas inibitórios os isolados que apresentaram halos iguais ou superiores a 0,7 cm. (BISCOLA et al. 2013). Quanto à atividade antimicrobiana por difusão em poços observou-se que os micro-organismos R1, F3 e F4 apresentaram inibição frente ao micro-organismo indicador *E. coli* (1,68 cm ± 0,08; 1,60 cm ± 0,06; 1,68 cm ± 0,08; respectivamente). Ao analisar a atividade antimicrobiana frente ao micro-organismo *L. monocytogenes* observou-se que o isolado R1 apresentou halo de inibição satisfatório (1,23 cm ± 0,05). Quanto à ação antimicrobiana dos isolados frente ao *S. aureus* observou-se que os isolados K1, K2, R1 apresentaram atividade antimicrobiana com halos de inibição de 1,35 cm ± 0,05; 1,20 cm ± 0,06; 0,77 cm ± 0,08, respectivamente. Ao analisar o micro-organismo indicador *Salmonella Enteritidis* não foi observada atividade antimicrobiana pelos isolados.

Por meio da análise de difusão em disco observou que somente os micro-organismos R1, K1 e K2 apresentaram inibição frente a *E. coli*. Ao analisar o efeito inibitório dos isolados frente aos demais micro-organismos indicadores não foi observada ação antimicrobiana.

Com relação a capacidade antioxidante pode-se observar pelo método de TBARS que, somente os micro-organismos F3 e F4 apresentaram inibição da peroxidação lipídica. Ao contrário, os demais micro-organismos analisados demonstraram oxidação perante o ácido tiobarbitúrico. É importante ressaltar que os micro-organismos controle (Y1 e Y2) não apresentaram capacidade antioxidante por este método.

A análise pelo método de DPPH revelou que todos os micro-organismos K1, K2, F3, F4 e R1 apresentaram capacidade antioxidante, confirmando assim, sua ação antioxidante perante a capacidade destas bactérias em sequestrar o radical DPPH, pela mudança significativa na sua coloração que passa da cor violeta para coloração amarela quando em contato com a substância antioxidante.

As indústrias de alimentos utilizam antioxidantes para evitar e/ou prevenir a deterioração dos produtos, aumentando a vida de prateleira dos mesmos e mantendo o seu valor nutricional, porém, também são de grande interesse na área da saúde, pois auxiliam na proteção das células e dos tecidos contra os danos oxidativos. No entanto, a indústria acaba optando em utilizar antioxidantes sintéticos pelo baixo custo e maior facilidade. Apesar da eficácia desses compostos na ação antioxidant, os mesmos vêm sendo questionados, uma vez que estes compostos podem propiciar efeitos tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos e, desta forma, vários estudos vêm sendo realizados em relação à produção de antioxidantes de fontes naturais (MERCADANTE et al. 2013).

Quanto a análise de virulência, os resultados encontrados demonstraram que todos os isolados apresentaram atividade enzimática negativa para gelatinase, lipase e DNAse, enquanto que, para a atividade hemolítica, foram classificados como α-hemólise, produzindo zonas verde-coloridas em torno das colônias inoculadas em Agar Sangue, sendo consideradas não hemolíticas, pois somente são considerados hemolíticos os micro-organismos que apresentarem zonas de lise ao redor das colônias (β -hemólise). Para o perfil fermentativo os micro-organismos analisados foram considerados como homofermentativos apresentando somente turvação do meio, porém sem produção de gás. PORTO et al. (2016) analisou amostras de queijo coalho artesanal para cepas de *Enterococcus* submetidas à avaliação da produção de DNAse e gelatinase, no qual constataram apenas atividade da enzima DNAse. Outro estudo realizado por MORAES et al. (2012) em amostras de leite e queijo também avaliaram a produção de gelatinase e DNAse, não sendo observada a produção de gelatinase, enquanto que a produção de DNAse foi observada em 100% dos micro-organismos probióticos analisados.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a maioria dos isolados apresentou atividade antimicrobiana frente a algum dos micro-organismos indicadores testados, como por exemplo, *E. coli*, *L. monocytogene*se *S. aureus*. Ainda, quando analisada a capacidade antioxidant observou-se que três isolados apresentaram inibição da peroxidação lipídica e, todos os isolados apresentaram capacidade de sequestro de radicais livres. Da mesma forma, todos os isolados foram negativos quanto a produção de gelatinase, lipase e DNAse, e classificados como homofermentativos. Estes resultados são de extrema importância, pois foi possível selecionar isolados isentos de virulência, com potencial inibição contra patógenos e ainda, com capacidade antioxidant (com destaque para o micro-organismo R1). Ressalta-se ainda que estes, podem ser utilizados futuramente como potencial probiótico (dados não publicados), tanto na alimentação humana como na alimentação animal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANVISA. Comissões Tecno-científicas de Acessamento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos: lista das alegações aprovadas. Acessado em 14 abril. 2016. Online. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecnico_lista_alega.htm.

2. AHIRE, J.J.; PATIL, K.P.; CHAUDHARI, B.L.; CHINCHOLKAR, S.B. *Bacillus* spp. of human origin: a potential siderophoregenic probiotic bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.164, n.3, p.386-400, 2011.
3. BANNERMAN, T.M. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In P. R. Murray (Ed.), *Manual of clinical microbiology*, Washington, DC: ASM Press, 2003; 8 ed., p. 384-404.
4. BARBOSA, O.; ARIZA, C.; ORTIZ, C.; TORRES, R. Kinetic resolution of (R/S)-propranolol (1-isopropylamino-3-(1-naphtoxy)-2-propanolol) catalyzed by immobilized preparations of *Candida antarctica* lipase B (CAL-B). *New Biotechnology*, v.27, n.6, p.844- 850, 2010.
5. BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, v.28, n.1, p. 25-30, 1995.
6. BISCOLA, V.; TODOROV, S.D.; CAPUANO, V.S.C.; ABRIQUEL, H.; GÁLVEZ, A.; FRANCO, B.D.G.M. Isolation and characterization of a nisin like bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product. *Meat Science*, v.93, n.3, p.607–613, 2013.
7. FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; CALLEWAERT, R.; DEVREESE, B.; VANBEEUMEN, J.; DEVUYST, L. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *Journal of Applied Microbiology*, v.94, p.214-229, 2003.
8. FREIRE, V.A.P. **Viabilidade de culturas probióticas de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. em iogurte adicionado de polpa e farinha do albedo de maracujá (*Passiflora edulis*)**. 2012, 141f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas.
9. MARRA, A.; DIB-HAJJ, F.; LAMB, L.; KACZMAREK, F.; SHANG, W.; BECKIUS, G.; MILICI, A.J.; MEDINA, I.; GOOTZ, T.D. Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.58, p.59-65, 2007.
10. MERCADANTE, A.Z.; CAPITANI, C.D.; DECKER, E.A.; CASTRO, I.A. Effect of natural pigments on the oxidative stability of sausages stored under refrigeration. *Meat Science*, v.84, p.718-726, 2013.
11. MILLS, S.; ROSS, R.P.; HILL, C.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. *International Dairy Journal*, v.21, n.6, p.377- 401, 2011.
12. MORAES, P.M.; PERIN, L.M.; TODOROV, S.D.; SILVA, J.R.; FRANCO, B.D.; NERO, L.A. Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. *Journal of Applied Microbiology*, v.113, n.2, p.318-328, 2012.
13. OHKAWA, H.; OHISHI, H.; YAGI, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*; v.95, n.2, p.351-358, 1979.
14. PORTO, B.C.; FUJIMOTO, G.; BORGES, M.F.; BRUNO, L.M.; CARVALHO, J.D.G. Determinantes de virulência em *Enterococcus* endógenos de queijo artesanal. *Revista de Ciência Agronômica*, v.47, n.1, p.69-76, 2016.
15. TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. *Journal of Basic Microbiology*, v.44, n.4, p.305-316, 2004.