

VIABILIDADE *IN VITRO* DE *Lactobacillus casei* CSL3 INCORPORADA EM QUEIJO *PETIT-SUISSE* NAS CONDIÇÕES DO TRATO GASTROINTESTINAL SIMULADO

MARINA VIEIRA FOUCHY¹; HELENA REISSIG SOARES VITOLA²; KHADIJA BEZERRA MASSAUT³; MARIA FERNANDA FERNANDES SIQUEIRA⁴; WLADIMIR PADILHA DA SILVA⁵; ÂNGELA MARIA FIORENTINI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – marinavieira01@gmail.com;

²Universidade Federal de Pelotas – helena_rsv@hotmail.com;

³Universidade Federal de Pelotas – khadijamassaut@gmail.com;

⁴Universidade Federal de Pelotas – maria.fernanda.fs97@gmail.com;

⁵Universidade Federal de Pelotas – vladimir.padilha2011@gmail.com;

⁶Universidade Federal de Pelotas – angefiore@gmail.com;

1. INTRODUÇÃO

Os consumidores estão, cada vez mais, preocupados com a qualidade de vida, e assim, a busca por alimentos que confirmam propriedades funcionais vem crescendo constantemente. Dentro dessa categoria, os alimentos probióticos se destacam, uma vez que oferecem benefícios à saúde do hospedeiro (SZAKÁLY et al., 2012). De acordo com FAO/WHO (2001), probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidade adequada, conferem benefícios à saúde do hospedeiro.

Para ser classificada como probiótica, uma bactéria deve apresentar determinados atributos e, entre esses está a resistência às barreiras impostas pelo trato gastrointestinal, como manter sua viabilidade quando em contato com a acidez gástrica, presença de enzimas (pepsina e pancreatina) e sais biliares bem como, serem capazes de chegar ao seu sítio de ação em concentrações adequadas para fornecer os benefícios propostos (MORELLI, 2000; MOTTA et al., 2006).

As bactérias ácido lácticas (BAL) compreendem o grupo mais representativo dos microrganismos probióticos (REDONDO, 2008). Dentro desse grupo, pesquisas mostram *Lactobacillus casei* como uma das espécies mais estudadas, por apresentar potencial comercial e principalmente, para a saúde (HILL et al., 2018). A bactéria tem sido adicionada em diversos produtos lácteos, como queijos, sorvete, leite fermentado, entre outros. (GARCÍA et al., 2019; SILVA et al., 2018).

Entende-se por queijo *petit-suisse*, o queijo fresco, não maturado, obtido por coagulação do leite com coalho e/ou enzimas específicas e/ou bactérias específicas, adicionado ou não de outras substâncias alimentícias (BRASIL, 2000).

Portanto, o presente estudo teve por objetivo avaliar a viabilidade *in vitro* de *Lactobacillus casei* CSL3 em queijo *petit-suisse* suplementado, frente às condições do trato gastrointestinal simulado.

2. METODOLOGIA

Para a simulação *in vitro* do trânsito gastrointestinal (TGI) foi utilizada a metodologia proposta por Madureira et al. (2010), com modificações. O teste foi realizado no tempo 0 e 49 dias de armazenamento do queijo *petit-suisse*.

Brevemente, 10 g de queijo foram adicionadas em 90 mL de solução salina acidificada em pH 2,5 e posteriormente, levado ao equipamento *Stomacher* por 30 segundos, para a simulação da mastigação. Logo após, separou-se a amostra em *shot* esterilizado e adicionou-se a enzima pepsina. Foi realizada a primeira contagem em placas com ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) sendo as mesmas incubadas à 37 °C, por 48 h, em anaerobiose. O conjunto permaneceu em equipamento *Shaker* por 90 minutos, a 130 rpm e 37 °C. Na sequência foi realizada a segunda contagem em placas e incubação nas mesmas condições citadas anteriormente. O pH foi alterado com solução de bicarbonato de sódio 1M até permanecer em pH 5. Posteriormente, adicionou-se pancreatina e bile. Novamente foi para o *Shaker*, 20 minutos, a 45 rpm e 37 °C. Realizou-se a terceira contagem em placas. O pH atingiu 6,5 com adição de solução de bicarbonato de sódio 1M novamente, e o *shot* foi para o *Shaker* por mais 90 minutos, 45 rpm e 37 °C. Realizou-se a última contagem em placas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode ser observado na Tabela 1 a concentração de *L. casei* CSL3 após a passagem por cada etapa do trânsito gastrointestinal simulado.

Tabela 1. Concentração de *Lactobacillus casei* CSL3 (log UFC.mL⁻¹) após sua passagem por cada fase do trânsito gastrointestinal simulado.

Tempo (dias)	Condições Gástricas (inicial)	Condições Gástricas (final)	Condições Duodeno	Condições Íleo
0	7,81±0,21	7,96±0,67	7,28±0,71	6,83±1,00
49	7,83±0,32	7,68±0,24	7,79±0,27	7,66±0,27

Nota-se uma queda na concentração inicial da bactéria quando comparada a final, para ambos tempos de armazenamento. Tal resultado torna-se esperado, quando *L. casei* CSL3 é exposto às condições adversas do trânsito simulado. Segundo a Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO, 2002) para o probiótico conferir o benefício proposto, o mesmo deve estar em concentrações de 6-7 log UFC.mL⁻¹.

Villarreal et al. (2013), desenvolveram duas formulações de queijos *petit-suisse*, prebiótica (F1) e probiótica (F2), com três bactérias diferentes (*L. acidophilus* La-5, *L. sakei* subsp. *sakei* 2a e *Bifidum animalis* subsp. *lactis* Bb-12). Após a digestão gástrica simulada, todas as bactérias estudadas perderam a viabilidade. Porém, em comparação entre os três microrganismos, *Bifidum animalis* Bb-12 exibiu uma capacidade de sobrevivência, significativamente, melhor do que as duas linhagens de *Lactobacillus* testadas. Assim, os autores obtiveram resultados abaixo dos adquiridos no presente estudo, no qual a bactéria *L. casei* CSL3 manteve-se viável em concentrações ≥ 6,83 log UFC.mL⁻¹, até o final do teste. Mesmo que a F2 tenha sido similar ao *petit-suisse* desenvolvido no presente estudo, a não sobrevivência das linhagens de *Lactobacillus* pode se dar por vários motivos, como presença ou ausência de genes, ocorrência de mutações, resistência, metabolismo, entre outros. Portanto, cada microrganismo reage de maneira diferente, mesmo considerando matriz alimentar similar.

Além disso, Carvalho (2010) presume que o teor de lipídios presente na matriz alimentar em que a bactéria se encontra influenciará na sobrevivência da

mesma, pelo fato dos lipídios protegerem o conteúdo de água da célula microbiana evitando o extravasamento e consequente morte desse microrganismo. Sendo assim, pode-se assegurar que o teor lipídico do queijo *petit-suisse* do presente estudo protegeu a bactéria *L. casei* CSL3.

Outro estudo que prova a importância do veículo alimentar para a sobrevivência das bactérias, foi realizado por Curto et al. (2011) que submeteram três espécies de *Lactobacillus* (*Lactobacillus casei* subsp. *shirota*, *Lactobacillus casei* subsp. *immunitas* e *Lactobacillus acidophilus* subsp. *johnsonii*) às condições do TGI simulado. Os testes foram realizados com água esterilizada e leite UHT, onde os microrganismos sobreviveram em maior escala no leite. Segundo Holzapfel et al. (2001) a água tem uma menor capacidade tamponante do que o leite. Portanto, o efeito tampão do leite pode proteger as células bacterianas contra a ação prejudicial do ambiente gástrico e duodenal, afirma Sirò et al. (2008).

As bactérias ácido lácticas apresentam uma característica, que é a sobrevivência em um pH relativamente baixo, diferentemente de outros microrganismos, como certos patógenos (NARVHUS; AXELSSON, 2003). As BAL possuem um sistema de transporte simultâneo de ácido láctico e de prótons para o exterior das células, que contribui para a homeostase do pH interno, fazendo com que essas bactérias não fiquem injuriadas a ponto de morrer quando estiverem em meios ácidos (TSENG e MONTVILLE, 1993).

4. CONCLUSÕES

A bactéria *Lactobacillus casei* CSL3 manteve-se viável durante a passagem pelo trânsito gastrointestinal *in vitro*. Portanto, pode-se afirmar que, quando presente no queijo *petit-suisse*, a bactéria apresenta potencial probiótico e pode colonizar o intestino, trazendo benefícios à saúde.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 53, de 29 de dezembro de 2000. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Petit suisse. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF.

CARVALHO, I. T. **Microbiologia dos Alimentos**. Recife: EDUFRPE, 2010.

CURTO, A. L.; PITINO, L.; MANDALARI, G.; DAINITY, J. R.; FAULKS, R. M.; WICKHAM, M. S. J. Survival of probiotic lactobacilli in the upper gastrointestinal tract using an *in vitro* gastric model of digestion. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1359-1366, 2011.

FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria**. 2001.

FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. WHO, London, Ontario. 2002.

GARCÍA, C.; BAUTISTA, L.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. A new synbiotic dairy food containing lactobionic acid and *Lactobacillus casei* **International Journal of Dairy Technology**, v. 72, p. 47-56, 2019.

HILL, D. I.; TOBIN, C.; HILL, C.; STANTON, C.; ROSS, R. P. The *Lactobacillus casei* group: History and health related application. **Frontiers in Microbiology**, v.9, p. 2107, 2018.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr.* v. 73, p. 365–373, 2001.

MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, p. 465–470, 2011.

MORELLI, L. *In vitro* selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, Norfolk, v. 1, n. 2, p. 59 - 67, 2000.

MOTA, R. M. et al. Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus* bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines. **BMC Biotechnology**, v. 6, 2006.

NARVUS, J. A.; AXELSSON, L. **Lactic Acid Bacteria** in: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, 2ª Ed. Academic Press, p. 3465-2472, 2003.

OZYURT, V. H. & ÖTLES, S. Properties of probiotics and encapsulated probiotics 807 in food. **ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 13(4), p. 413–424, 2014.

SILVA, H. L.; BALTHAZAR, C. F.; ROCHA, R. S.; MORAES, J.; ESMERINO, E. A.; SILVA, M. C.; CRUZ, A. G. Sodium reduction and flavor enhancers addition: Is there an impact on the availability of minerals from probiotic prato cheese? **LWT-Food Science and Technology**, v. 9, p. 287-292, 2018.

SIRÓ, I. et al. Functional foods. Product development, marketing and consumer acceptance – a review. *Appetite*, London, v. 51, n. 3, p. 456-467, 2008.

TSENG, C.H.; MONTVILLE, T. J. Metabolic regulation and distribution in *Lactobacillus*. Causes and consequences. **Biotechnol.**, v. 9, p.113-121,1993.

VILLARREAL, M. L. M.; PADILHA, M.; VIEIRA, A. D. S.; FRANCO, B. D. G. M.; MARTINEZ, R. C. R.; SAAD, S. I. Advantageous direct quantification of viable closely related probiotics in *petit-suisse* cheeses under in vitro gastrointestinal conditions by Propidium Monoazide--qPCR. **Plos One**. 2013