

## POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIA ÁCIDO LÁTICA PROVENIENTE DE KEFIR

PAOLA QUEVEDO DA COSTA<sup>1</sup>; JOSEANA CASTANHEIRA MACHADO<sup>2</sup>; KATERIN MILENA GALLEGOS SOSA<sup>3</sup>; TAICIANE GONÇALVES<sup>4</sup>; SIMONE PIENIZ<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade federal de Pelotas- quevedopaola97@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade federal de Pelotas- joseanecastanheiram@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade federal de Pelotas- katerinmgsnutri@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade federal de Pelotas- ta.ici@hotmail.com

<sup>5</sup>Universidade federal de Pelotas- nutrisimone@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

Probióticos são definidos como “micro-organismos vivos que promovem benefícios a saúde do hospedeiro se consumidos em quantidades adequadas” (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WHO WORKING GROUP, 2001). Para que os benefícios à saúde sejam obtidos, é necessário que o produto apresente concentração mínima para consumo, variando conforme o órgão de orientação. A exemplo, a FAO (2002) recomenda um mínimo de 6 log Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama de alimento diariamente.

As células probióticas depois de ingeridas devem ser capazes de sobreviverem às condições adversas no trato gastrointestinal como suco gástrico, sais biliares e enzimas digestivas, além de manter sua viabilidade e atividade metabólica no intestino para exercerem os efeitos benéficos aos hospedeiros (SAAD, 2006; ARAÚJO, 2007).

A aplicação tecnológica de bactérias ácido lácticas (BAL) em alimentos vêm sendo amplamente explorada, tendo em vista o aumento da demanda de alimentos fermentados funcionais, estimulando o desenvolvimento de novos produtos. Os gêneros que mais representam esta classe são os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (MATHARA et al., 2008).

Devido este fato, uma ampla variedade de produtos lácteos vem sendo estudada, utilizando estes aliados microbianos de uma forma eficiente para suprir as necessidades diárias de alguns micronutrientes e se obter uma alimentação mais natural. Esses produtos lácteos abrangem uma ampla variedade de produtos incluindo bebidas como iogurtes, queijos, kefir e demais produtos fermentados. Normalmente o kefir apresenta uma característica organoléptica com textura viscosa e sabor levemente azedo. Comumente utiliza-se leite de vaca para sua preparação, mas pode ser proveniente de outras origens como bubalino, ovino ou caprino (BOURRIE et al., 2016).

Nesse sentido, o isolamento e a caracterização de novas linhagens oriundas de nichos pouco explorados, podem ser favoráveis para obtenção de micro-organismos com propriedades funcionais distintas (ORTU et al., 2007).

Diante do exposto, o presente estudo objetivou a caracterização de BAL com potencial probiótico, provenientes de kefir, em ensaios *in vitro*.

## 2. METODOLOGIA

O isolado de kefir utilizado no presente estudo foi obtido da Coleção Conservada em Estoque do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, da Faculdade de Agronomia, Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Campus Capão do Leão, localizado na cidade de Capão do Leão-RS, identificado como A2.

### **Tolerância á condições ácidas**

A resistência do isolado sob diversas condições ácidas foi realizada de acordo com Erkkila & Petaja (2000), com algumas modificações. O isolado A2 foi inoculado em caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) a 37 °C por 24 h, e testado sob diferentes condições ácidas em caldo MRS ajustado com ácido clorídrico (HCL) concentrado (pH 2, 3 e 4), sendo que o pH 7 foi usado como controle. Um mililitro (1 mL) da cultura foi adicionada aos tubos contendo 10 mL de caldo MRS acidificado. Após a exposição às condições ácidas por 0 h, 2 h, e 4 h, diluições seriadas de cada tempo foram inoculadas em placas contendo ágar MRS e incubadas à 37 °C por 24 h. Os dados foram expressos como valores de log de Unidades Formadoras de Colônias por mL (log.UFC.mL<sup>-1</sup>). A viabilidade celular foi calculada com a seguinte equação: % de sobrevivência: contagem final (UFC.mL<sup>-1</sup>) / controle (UFC.mL<sup>-1</sup>) x 100.

### **Resistência aos sais biliares**

Após a incubação em caldo MRS à 37 °C por 24 h, células do isolado foram coletadas por centrifugação (10000 x g por 15 min à 4 °C) e a avaliação da resistência bacteriana aos sais biliares foi realizada utilizando 10 mL de caldo MRS esterilizado, suplementado com uma mistura de colato de sódio e desoxicolato de sódio (Sigma) na proporção de 1:1, obtendo uma concentração final de 0,1%, 0,3%, 0,5% e 1% (m/v). A contagem de células viáveis foi determinada, quando expostas aos sais biliares por 0 h, 2 h, e 4 h de incubação, em placas contendo ágar MRS. Em cada período foram realizadas diluições seriadas das amostras e incubadas à 37 °C por 24 h. Os dados foram expressos como valores de log.UFC.mL<sup>-1</sup> (PERELMUTER et al., 2008).

### **Tolerância ao trato gastrointestinal**

A avaliação de tolerância a sobrevivência ao trato gastrointestinal foi avaliada de forma simulada conforme Huang & Adams (2004). Após 24 h de incubação a 37 °C foram separadas por centrifugação (1200 x g por 5 min) as células do isolado, foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salina (0,85%) (PBS, Laborclin®), e ressuspendidas em solução salina a 0,5%. Uma alíquota de 200 µl da suspensão celular foi ministrada a 0,3 mL de solução salina e 1 mL de suco gástrico ou intestinal simulado e incubados a 37 °C. A contagem de células viáveis foi realizada no tempo 0 h, 2 h e 4 h para a tolerância gástrica e para a determinação da tolerância ao trânsito no intestino delgado. O suco gástrico simulado consistiu em pepsina (3 mg.mL<sup>-1</sup>) e pH 2 com ou sem a adição de leite integral; enquanto o suco intestinal simulado foi composto por pancreatina (1 mg.mL<sup>-1</sup>), pH 8 com ou sem adição de 0,5% de sais biliares. O efeito da presença de um alimento na sobrevivência durante o trânsito gástrico em pH 2 foi avaliado da mesma forma, porém, substituindo a solução salina (0,85%) por 0,3 mL de leite integral reconstituído a 10% (m/v). A contagem do número de células viáveis durante a simulação pelo trato gástrico e pelo trato intestinal foi

realizada nos tempos 0 h, 2 h e 4 h em placas de Petri contendo ágar MRS. Os dados foram expressos como valores de log.UFC.mL<sup>-1</sup>.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### **Tolerância às condições ácidas**

De acordo com os resultados obtidos na análise de condições ácidas, pode-se observar que o micro-organismo A2 apresentou sobrevivência em todos os tempos para os tratamentos pH 4, pH 3 e pH 2. No entanto, nos tempos 2 h e 4 h, foi observado uma diminuição da viabilidade quando comparado ao controle. Segundo Abdel-Daim et al. (2013), cepas de *Lactobacillus* mantiveram a viabilidade quando as expuseram em um ambiente ácido nos valores de pH 2 e pH 3, resultados semelhantes aos encontrados em nosso estudo.

#### **Resistência aos sais biliares**

Quando analisada a resistência aos sais biliares, observou-se na concentração de 0,1% de sais biliares em todos os tempos analisados que o micro-organismo A2 se manteve viável em relação ao controle, assim como observado nas demais concentrações de 0,25%, 0,5%, 1% e 1,5%, as quais apresentaram viabilidade em todos os tempos analisados. Segundo Huang & Adams (2004) a concentração de sais biliares entre 0,1 e 0,3% para a avaliação *in vitro* da passagem pelo intestino delgado já tem sido reconhecido como potencial probiótico. Portanto, os achados em nosso estudo, mostram resultados promissores para o efeito probiótico.

#### **Tolerância ao trânsito gastrointestinal**

Para os resultados da pepsina pH 2 e pH 3 nos tempos 0 h, 2 h e 4 h, o micro-organismo A2 se manteve viável, porém, apresentou viabilidade inferior ao controle em todos os tempos analisados. Em relação à pancreatina pH 8 e pancreatina pH 8 + 1,5% de sais no tempo 0 h, pode-se observar uma viabilidade superior em relação ao controle. Quando analisados os tempos de 2 h e 4 h observou-se viabilidade semelhante ao controle. Em estudo realizado por Meira (2011) sobre tolerância ao trânsito intestinal, a contagem de células viáveis não diferiu significativamente do tempo inicial após 4 h com pancreatina pH 8 e houve redução de aproximadamente 1 ciclo logarítmico na presença de pancreatina pH 8 + 0,5% de sais biliares.

### 4. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos, pode-se concluir que o isolado A2 apresentou potencial probiótico em todos os parâmetros analisados, demonstrando tolerância ao pH intestinal simulado, tolerância na presença de sais biliares e às enzimas intestinais simuladas.

### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION OF THE UNITED NATIONS AND WHO WORKING GROUP. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. [s. l.], p. 1–11, 2002

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

ARAÚJO, Emiliane Andrade. Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Cottage adicionado de *Lactobacillus delbreuckii* UFV H2b20 e de inulina. 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.

MATHARA, J. M.; SCHILLINGER, U.; KUTIMA, P. M.; MBUGUA, S. K.; GUIGAS, C.; FRANZ, C.; HOLZAPFEL, W. H. Functional Properties of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Maasai Traditional Fermented Milk Products in Kenya. *Curr Microbiol*, v. 56, p. 315-321, 2008.

BOURRIE B.; WILLING B.; COTTER P. The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir. *Frontiers in Microbiology*, Suíça, v. 7, n.647, p. 1- 17, 2016.

ORTU, S.; FELIS, G. E.; MARZOTTO, M.; DERIU, A.; MOLICOTTI, P.; SECHI, L. A.; DELLAGLIO, F.; ZANETTI, S. Identification and Functional Characterization of *Lactobacillus* Strains Isolated from Milk and Gioddu, a Traditional Sardinian Fermented Milk. *International Dairy Journal*, v. 17, p. 1312–1320, 2007.

ERKKILA, S.; PETAJA, E. Screening of commercial meat starter cultures at low ph and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*, v. 55, p. 297-300, 2000.

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.

HUANG, Y. & ADAMS, M. C. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v. 91, p. 253-260, 2004.

ABDEL-DAIM, A.; HASSOUNA, N.; HAFEZ, M.; ASHOR, M. S. A.; ABOULWAFA, M. M. Antagonistic activity of *Lactobacillus* isolates against salmonella typhi in vitro. *BioMed Research International*, p. 1-12, 2013

HUANG, Y.; ADAMS, M. C. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v. 91, p. 253-260, 2004.

MEIRA, Stela Maris Meiste. Potencial probiótico de bactérias lácticas e atividades biológicas de leite e queijo de ovelha. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.