

RESISTÊNCIA IN VITRO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE IOGURTES BRASILEIROS AO SUCO GÁSTRICO E SAIS BILIARES¹

Lais Gonçalves Botelho², Kamila Soares Coelho³, Natália Parma Augusto de Castilho⁴, Adriano França da Cunha⁵, João Paulo Miranda Falcão³, Mariana Fonseca Nunes³

Resumo: *O iogurte tem alto valor biológico por possuir bactérias ácido láticas que podem ter função probiótica, mas tais bactérias devem ser resistentes à acidez gástrica e à toxicidade da bile. Objetivou-se, com este trabalho, avaliar a resistência in vitro ao suco gástrico e aos sais biliares de bactérias ácido láticas isoladas de quatro amostras de iogurtes brasileiros (A, B, C e D). As bactérias ácido láticas isoladas de todos os iogurtes foram resistentes ao suco gástrico simulado, principalmente as do produto C (93,5%). Em números percentuais, o isolado do produto B (62,4%) apresentou menor resistência em relação aos demais isolados. Entretanto, todas as bactérias não apresentaram resistência aos sais biliares, o que pode ter sido resultado da baixa síntese da hidrolase Bile Salt Hydrolase. Para garantir melhores propriedades probióticas, as bactérias dos iogurtes brasileiros devem possuir maior resistência aos sais biliares.*

Palavras-chave: *acidez, bile, isolamento, lacteio, probiótico*

Abstract: *Yogurt has high biological value by owning lactic acid bacteria, which may have probiotic function. However, these bacteria should be resistant to gastric acidity and toxicity of bile. The objective of study was to evaluate the in vitro resistance to gastric juice and bile salts of lactic acid bacteria isolated from four samples of Brazilian yogurts (A, B, C and D). The lactic acid bacteria isolated*

¹Parte do Trabalho de Conclusão de Curso do primeiro autor;

²Graduada em Medicina Veterinária – FACISA/UNIVIÇOSA. e-mail: laisgbb@yahoo.com.br

³Graduando(a) em Medicina Veterinária – FACISA/UNIVIÇOSA. e-mail: kamilas.coelho@hotmail.com; joapaulofalcao@hotmail.com; mariananunes10@hotmail.com

⁴Doutoranda em Medicina Veterinária – UFV. e-mail: nataliaparma@hotmail.com

⁵Professor em Medicina Veterinária – FACISA/UNIVIÇOSA. e-mail: adrianofcunha@hotmail.com.br

from all yogurts were resistant to simulated gastric fluid, mainly bacteria isolated product C (93.5%). In percentage numbers, isolated from B product (62.4%) had lower resistance than others isolated. However, no bacteria was resistance to bile salts, which could have been the result of low synthesis of Bile Salt Hydrolase. To ensure best probiotic properties, bacteria of Brazilian yogurts must have greater resistance to bile salts.

Keywords: *acidity, bile, dairy, isolation, probiotic*

Introdução

As propriedades nutricionais do iogurte são relevantes em razão de conter proteínas de alto valor biológico, sais minerais, como cálcio e fósforo, e níveis consideráveis de vitaminas do complexo B, além de baixo teor de gordura (VINDEROLA et al., 2008).

De acordo com Food and Agriculture Organization e World Health Organization, microrganismos probióticos são aqueles que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Dentre o grupo de bactérias ácido lácticas, algumas estirpes podem apresentar efeitos probióticos, como a capacidade de produzir substâncias antimicrobianas (bacteriocinas), responsáveis pelo antagonismo a patógenos (FAO/WHO, 2002).

Ao serem ingeridas, as bactérias ácido lácticas devem ser resistentes ao suco gástrico e à toxicidade dos sais biliares. Elas devem ser capazes de ultrapassar as barreiras do trato gastrointestinal e chegar em número viável para vigorarem a superfície do intestino (KHEADR, 2006). Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência in vitro de bactérias ácido lácticas isoladas de iogurtes brasileiros, coletados em estabelecimentos comerciais de Viçosa (MG), ao suco gástrico e aos sais biliares.

Material e Métodos

Em agosto de 2014, foram coletados quatro lotes de marcas diferentes de iogurtes brasileiros parcialmente desnatados, dentro do prazo de validade. Para isolamento e identificação de bactérias ácido lácticas, foram realizadas

diluições centesimais (10⁻⁵, 10⁻⁶ e 10⁻⁷) das amostras de iogurtes em solução salina 0,85 % (p/v) e, posteriormente, uma alíquota de 100 µL de cada diluição foi semeada sobre placa de Petri contendo meio ágar Mann, Rogosa e Sharpe (MRS - Difco, Detroit, United States) (5,5 % de meio / 1,5 % de ágar). Os inóculos foram espalhados com o auxílio de alça de Drigalski em superfície e, depois de completa absorção, as placas foram incubadas de forma invertida em estufa, por 48 horas, a 37°C, sob aerobiose. Após o isolamento das bactérias, foram realizados os testes Gram para diferenciação morfofototintorial e catalase, bem como para identificação bioquímica de bactérias ácido lácticas.

Os testes de resistência ao suco gástrico e aos sais biliares foram realizados em duplicata, de acordo com metodologia modificada de Vinderola et al. (2008). Cada isolado foi ativado três vezes em caldo MRS (Difco), sendo que a última ativação foi realizada em um volume de 20 mL. Após o crescimento, cada cultura foi transferida para tubos de polipropileno (50 mL), com tampas rosqueáveis, previamente esterilizados. A cultura foi centrifugada a 2.750 x g por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado; e o concentrado de células foi suspenso em 2 mL de caldo MRS. O concentrado celular foi ajustado, adicionando-se gotas do mesmo em tubos contendo 5 mL de caldo MRS, estéril, até atingir Densidade Óptica (DO) de 0,9±0,2 em espectrofotômetro, a 600 nm. O concentrado celular padronizado de cada cultura foi utilizado para testes de resistência ao suco gástrico e aos sais biliares.

A partir do concentrado de células padronizado (DO₆₀₀ 0,9), uma alíquota foi inoculada em tubos contendo 10 mL de suco gástrico artificial (2 g de cloreto de sódio; 3,2 g de pepsina; 7 mL de ácido clorídrico concentrado; 1000mL de água destilada; e pH final de 2) na proporção de 5% . Após 30 minutos de exposição ao suco gástrico simulado, a cultura foi centrifugada a 2.750 x g por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado; e o concentrado de células foi suspenso em 5 mL de caldo MRS. Os tubos foram mantidos a 37°C; e o crescimento foi avaliado em espectrofotômetro a 600 nm, em intervalos de duas horas, durante 12 horas de incubação.

O concentrado de células padronizado (DO₆₀₀ 0,9) de cada cultura ainda foi inoculado em tubos contendo 5 mL de caldo MRS na proporção de 5%, adicionando-se ou não (controle) 0,3% de Oxgall, meio que simula os

sais biliares intestinais. Os tubos foram mantidos a 37°C; e o crescimento foi avaliado em espectrofotômetro a 600 nm, em intervalos de duas horas, durante 12 horas de incubação.

Os testes de resistência aos sais biliares e ao suco gástrico foram avaliados qualitativamente de acordo com Walker e Gilliland (1993). As áreas de crescimento dos micro-organismos (Absorbância x Horas) foram calculadas utilizando-se o programa computacional Sigma Plot (Systat Software Inc., USA). A resistência do crescimento das bactérias isoladas foi calculada pela diferença entre as áreas das curvas de crescimento e a área de crescimento controle.

Resultados e Discussão

O perfil de resistência ao suco gástrico dos isolados dos quatro iogurtes está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Resistência ao suco gástrico de bactérias ácido láticas isoladas de iogurtes

Produto	Área (AxH)*	Resistência (%)
A	10,509	75,7
B	8,660	62,4
C	12,985	93,5
D	11,510	83,9
Controle	13,888	100,0

* Absorbância x Horas

Observou-se que as resistências das bactérias ácido láticas foram maiores que 60%. Portanto, as bactérias ácido láticas possuem alta resistência (WALKER e GILLILAND, 1993), principalmente o isolado do produto C (93,5%). Em números percentuais, o isolado do produto B (62,4%) apresentou menor resistência que os demais.

Para se manter viáveis e promover efeitos benéficos, as bactérias ácido láticas devem resistir ao suco gástrico, meio que contém enzimas digestivas que funcionam em pH extremamente baixo. Ressalta-se que muitas bactérias não sobrevivem bem em pH ácido. Os efeitos adversos do baixo pH na fisiologia da bactéria ainda não foram completamente entendidos, mas a acidificação interna reduz a atividade de enzimas sensíveis, o que resulta em danos para as

proteínas e para o DNA bacteriano (LEEBER et al., 2008).

Vinderola et al. (2008) relatam que algumas bactérias ácido lácticas apresentam maior resistência que outras ao pH baixo. Apesar de menor resistência das bactérias do iogurte B, os resultados do presente estudo sugerem a utilização das bactérias dos produtos, principalmente do produto C, que apresentou maior resistência ao suco gástrico simulado.

Além de ter que tolerar o pH ácido no estômago, as bactérias têm como desafio os sais biliares intestinais. A resistência a esses sais constitui uma importante característica fisiológica, uma vez que as estirpes devem estar viáveis ao alcançarem o intestino delgado. Entretanto, as bactérias ácido lácticas isoladas apresentaram baixas resistências aos sais biliares, ou seja, menores que 20% (WALKER e GILLILAND, 1993) (Tabela 2).

Tabela 2. Resistência aos sais biliares de bactérias ácido lácticas isoladas de iogurtes

Produto	Área (AxH)*	Resistência (%)
A	1,957	13,3
B	1,949	13,2
C	1,687	11,4
D	2,058	13,9
Controle	14,754	100,0

* Absorbância x Horas

Couret et al. (2004) observaram que 38,7% de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru resistiram a 0,3% de Oxgall após três horas de incubação. Vinderola et al. (2008) também avaliaram 19 amostras de bactérias ácido lácticas isoladas do trato gastrointestinal humano, sendo que todas as amostras foram resistentes ou pouco inibidas aos sais biliares. Tais resultados divergem dos resultados do presente estudo.

Kheadr (2006) verificou o perfil de resistência de 13 estirpes de bactérias ácido lácticas em diferentes concentrações de Oxgall após 24 horas. Nesse estudo, a maioria das bactérias não atingiu alta absorvância após seis horas de incubação a 37°C, a concentrações menores que 0,3% de Oxgall. Apenas *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus plantarum* foram sensíveis na presença de 0,4% de Oxgall.

A resistência de bactérias aos sais biliares é o resultado da atividade da enzima hidrolase Bile Salt Hydrolase (BSH). A bile é secretada várias vezes

ao longo do dia no trato intestinal superior e, portanto, a BSH desconjuga os ácidos biliares, reduzindo o efeito tóxico ao micro-organismo (MANZONI et al., 2008). As bactérias isoladas dos iogurtes no presente estudo podem não ter produzido tal enzima. Para serem consideradas probióticas, devem produzir BSH, a fim de revigorar a carga bacteriana no trato intestinal.

Conclusões

As bactérias ácido lácticas de iogurtes brasileiros possuem boa resistência ao suco gástrico simulado, mas, para garantir melhores propriedades probióticas, devem possuir maior resistência aos sais biliares.

Referências Bibliográficas

COEURET, V.; GUEGUEEN, M.; VERNOUX, J.P. In vitro screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. **Journal of Dairy Research**, v.71, p.451-460, 2004.

FAO/WHO, Food and Agriculture Organization/ World Health Organization. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. 2002. 11p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. Acesso em: 13 de março de 2014.

JIN, L.Z.; HO, Y.W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing Lactobacillus cultures. **Poultry Science**, v.77, n.9, p.1259-1265, 1998.

KHEADR, E.E. Impact of acid and oxgall on susceptibility of probiotic lactobacilli. **African Journal of Agricultural Research**, v.1, p.172-181, 2006.

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; KEERSMAECKER, S.C. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. **Microbiology and**

Molecular Biology Reviews, v.72, n.4, p.728, 2008.

MANZONI, M.S.J.; CAVALLINI, D.C.U.; ROSSI, E.A. Efeitos do consumo de probióticos nos lípides sangüíneos. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.3, p.351-360, 2008.

VINDEROLA, C.G.; CAPELLINI, B.; VILLARREAL, F. Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. **Food Science and Tecnology**, v.41,n.1678-1688, 2008.

WALKER, D.K.; GILLILAND, S.E. Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.956-961, 1993.