

VIABILIDADE DE *Lactococcus lactis* R7 EM IOGURTE ADICIONADO DE EXTRATO DE ARAÇÁ APÓS A PASSAGEM PELO TRATO GASTROINTESTINAL *IN VITRO*

VITÓRIA LOPES ROCHA¹, KHADIJA BEZERRA MASSAUT², MARIA FERNANDA
FERNANDES SIQUEIRA³, ELISA DOS SANTOS PEREIRA⁴, PEDRO
FERNANDES VIANA⁵ ÂNGELA MARIA FIORENTINI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – vitoriatro2@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – khadijamassaut@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – maria.fernanda.fs97@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – lisaspereira@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – fernandes199921@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – angefiore@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As bactérias probióticas, para fornecer benefícios aos indivíduos, quando ingeridas devem ser capazes de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal (TGI), mostrar resistência ao ácido estomacal e aos sais biliares, e ainda serem capazes de sobreviver e proliferar no intestino (VANDENPLAS et al., 2014).

Lactococcus lactis (*L. lactis*), pertence ao grupo de bactérias ácido-láticas (BAL), é muito utilizada para a fermentação láctica dos alimentos pela produção de ácidos orgânicos, além de ajudar na preservação dos produtos (SONG et al., 2017). Além disso, a bactéria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 (*L. lactis* R7) que foi isolada por CUNHA (2017) e foi avaliada nesse estudo, apresentou potencial probiótico *in vitro*, pois mostrou tolerância ao pH ácido e sais biliares. Segundo EL-SALAM & EL-SHIBINY (2015), além de passar por essas condições de estresse é recomendado que permaneça em concentrações $\geq 6 \log \text{ UFC g}^{-1}$ ou mL^{-1} ao fim da passagem pelo TGI.

Entre os produtos lácteos, os leites fermentados favorecem a viabilidade de probióticos durante o período de armazenamento. O iogurte é um leite fermentado, resultante do processo de fermentação láctica, adicionado ou não de frutas, açúcar e outros ingredientes que melhorem sua apresentação e modifiquem seu sabor (Robert, 2008). Desta forma, o araçá (*Psidium cattleianum* Sabine), fruta nativa do Brasil, apresenta sabor agradável e único, e contém alto teor de compostos bioativos (PEREIRA et al., 2018), poderia melhorar a composição nutricional e as características sensoriais do iogurte.

Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7, pela passagem no TGI *in vitro* quando presente em diferentes matrizes alimentares como extrato de araçá, iogurte e iogurte adicionado de extrato de araçá.

2. METODOLOGIA

A bactéria potencialmente probiótica *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7, isolada de ricota (acesso GenBank - KF879126), foi previamente ativada em caldo De Man Rogosa & Sharpe (MRS) por 24 horas a 37 °C. Posteriormente, alíquotas do cultivo foram centrifugadas por 10 minutos a 7.000 rpm e na sequência, o *pellet* de células foi ressuspensão em solução salina 0,85% e, após a realização de duas lavagens, as suspensões celulares foram ajustadas para uma turvação correspondente a 4 na escala de *Mc Farland* ($\sim 12 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$).

O extrato de araçá foi preparado a partir das polpas/cascas da fruta, liofilizadas. As amostras foram trituradas com etanol 95% (1:4, p/v) durante 5 min em ultraturrax. Os homogeneizados foram centrifugados e o sobrenadante coletado. Após isso, foram concentrados por evaporação a vácuo, até total eliminação do etanol e, congelados para posterior liofilização.

Para a realização do teste, foi avaliada a viabilidade de *L. lactis* R7, sob a passagem ao TGI (fase gástrica e intestinal), quando presente nas matrizes alimentares: extrato de araçá, iogurte natural e iogurte adicionado de extrato de araçá. Misturou-se 0,2 mL da suspensão celular com 0,3 mL de extrato de araçá (4%), iogurte ou iogurte com araçá em 1 mL de suco gástrico (pepsina) na fase gástrica ou 1 mL de suco intestinal (pancreatina e sais biliares) na fase intestinal e incubou-se a 37 °C.

A viabilidade celular foi verificada pela inoculação de 20 µL das soluções gástricas contendo a bactéria, em placas com ágar MRS nos tempos 0, 15, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos e das soluções intestinais no tempo 0 e 240 minutos e, as placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas, em anaerobiose. A viabilidade foi determinada a partir das contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) com aplicação da fórmula: $[(n^{\circ} \text{ colônias} \times 0,2) / 1,5]$ (HUANG; ADAMS, 2004). O teste foi realizado em duplicata.

A análise estatística foi realizada no programa Graphpad Prism® 6.0, através dos testes: Two-way Anova e Tukey para correlação de variância entre as diferentes matrizes e os tempos, considerando-se o nível de significância de ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise de variância observou-se diferença significativa em relação às diferentes matrizes para a fase gástrica ($p = 0,0002$) onde o extrato de araçá se destacou e, teve também o melhor resultado entre as matrizes e tempos na fase intestinal ($p = 0,0141$ e $p = 0,0207$, respectivamente). Para todas as matrizes e tempos, a viabilidade se manteve acima do recomendado ($\geq 6 \log$ UFC/mL) e, os resultados podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Viabilidade de de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 à simulação ao trato gastrointestinal em diferentes matrizes alimentares

Fase	Matriz alimentar (log UFC mL ⁻¹)		
	Extrato de araçá	iogurte	iogurte + Extrato de araçá
Gástrica			
T0	9,23 ± 0,110	9,06 ± 0,020	8,74 ± 0,040
T15	9,54 ± 0,055	8,95 ± 0,050	8,74 ± 0,200
T30	9,76 ± 0,050	8,90 ± 0,050	8,24 ± 0,200
T60	9,42 ± 0,035	8,85 ± 0,000	8,78 ± 0,075
T120	9,37 ± 0,065	8,78 ± 0,075	8,15 ± 0,150
T180	9,13 ± 0,050	8,70 ± 0,000	8,95 ± 0,200
T240	9,03 ± 0,080	8,60 ± 0,000	8,50 ± 0,200
Intestinal			
T0	9,92 ± 0,070 aA	9,02 ± 0,020 aA	9,36 ± 0,095 aA
T240	9,58 ± 0,045 aA	8,48 ± 0,000 bB	8,80 ± 0,200 aB

Resultados expressos em média \pm desvio padrão; T = tempo (minutos). Letras minúsculas indicam diferença estatística entre as colunas (Tukey); Letras maiúsculas indicam interação estatística entre alimento e tempos (Tukey).

Segundo ROSOLEN et al. (2019), células livres de *L. lactis* R7 quando expostas ao suco gástrico apresentaram em todos os pH testados, decréscimos de 2,18, 1,00 e 1,78 ciclos logarítmicos para pH de 2,0, 2,5 e 3,0 respectivamente. No entanto, foi observado no presente estudo que no extrato de araçá, iogurte e iogurte com extrato de araçá, *L. lactis* R7 apresentou um decréscimo de 0,20, 0,46 e 0,24 ciclos logarítmicos respectivamente, sendo assim constatamos que as matrizes alimentares ajudaram na viabilidade da bactéria, visto que, não houve um decréscimo tão acentuado na sua concentração.

As simulações do TGI realizadas que continham extrato de araçá, apresentaram uma menor perda na viabilidade e, tal resultado pode estar relacionado, segundo WU et al., (2020), ao fato de que os compostos fenólicos podem ser capazes de inibir enzimas digestivas específicas. Ao comparar os resultados obtidos no presente estudo, com os resultados obtidos por ANTUNES (2018), onde foi verificado que sucos de frutas ácidas como laranja, limão e uva promovem uma diminuição de até de 3 log na viabilidade de *L. acidophilus* da fase gástrica a fase intestinal, ficou evidente que a diminuição de viabilidade (< de 1 log) de *L. lactis* subsp. *lactis* R7 pode realmente ter sido inferior devido a sua composição de compostos fenólicos.

Na matriz extrato de araçá + iogurte, *L. lactis* R7 teve uma perda de 0,24 log na fase gástrica, e na fase intestinal 0,56 ciclos logarítmicos, totalizando 0,8 log entre as duas fases. Segundo NASCIMENTO (2016), para o iogurte de leite caprino sabor goiaba com a bactéria *L. acidophilus* houve uma variação de 0,96 log no TGI, onde concluímos que o extrato de araçá ajuda na viabilidade da bactéria pelo TGI.

Na simulação com iogurte, nas fases gástrica e intestinal, pode-se perceber uma maior redução nas contagens quando comparado às que contém araçá (extrato e iogurte + extrato). Segundo VIEIRA et al., (2011), no leite de cabra houve uma redução de 4 log de *L. paracasei* LPC37 na fase gástrica e 0,54 log na fase intestinal. Isso não ocorreu no iogurte com *L. lactis* R7 na fase gástrica onde decaiu 0,46 log, porém ocorreu na fase intestinal também com uma diminuição de 0,54 log.

4. CONCLUSÕES

Os ensaios de *L. lactis* R7 na passagem do TGI *in vitro*, demonstraram que a matriz alimentar tem uma influência significativa na viabilidade de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7, que apresentou alta taxa de viabilidade, destacando-se o extrato de araçá como a matriz que mais favoreceu a bactéria em questão, frente às condições do TGI simulado chegando a 9,92 UFC mL⁻¹ na fase gástrica e 9,28 UFC mL⁻¹ na fase intestinal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, L. L. Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* livre e microencapsulado em sucos funcionais. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)**, Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Câmpus Medianeira, Medianeira, 2018.
- CHAVES, A. C. S. D.; SANT'ANNA, F. E. B.; ANTUNES, L. A.; TORREZAN, R. Processamento de Leite Fermentado Probiótico com um Preparado de Albúmen

- Sólido de Coco Verde. **Embrapa**, Comunicado Técnico 246, Rio de Janeiro, RJ, p. 2-7, 2021.
- CUNHA, C. C. Caracterização de *Enterococcus durans* LAB18se *Lactococcus lactis* subsp *lactis* R7 isolados de queijos. **Dissertação** - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2017.
- EL-SALAM, M. H. A.; EL-SHIBINY, S. Preparation and properties of milk proteins-based encapsulated probiotics: a review. **Dairy Science & Technology**, 2015. v. 95, p. 393-412. DOI: 10.1007/s13594-015-0223-8.
- HUANG, Y. & ADAMS, M. C. (2004). *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, 91(3), 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.07.001>
- PEREIRA, E. dos S.; VINHOLES, J.; FRANZON, R. C.; DALMAZO, G., VIZZOTTO, M., & NORA, L. *Psidium cattleianum* fruits: A review on its composition and bioactivity. **Food Chemistry**, v. 258, p. 95-103, 2018.
- ROBERT, N, F. Fabricação de iogurtes. **Dossiê técnico**. Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro REDETEC, 2008.
- ROSOLEM, M. D. Microencapsulação simbiótica de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 usando soro de queijo e inulina por *spray drying* e aplicação em diferentes matrizes alimentares. **Tese** - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2020.
- SILVA, C. C. Avaliação da sobrevivência *in vitro* de *Lactococcus lactis* QMF 11 em presença de sais biliares como critério de atividade probiótica. 35 f. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)** - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2020.
- SILVA, A. B. N. da; UENO, M. Avaliação da viabilidade das bactérias lácticas e variação da acidez titulável em iogurtes com sabor de frutas. **Rev. Inst. Latic.** “Cândido Tostes”, nº 390, 2013.
- SILVA, T. C. M. da; SILVA, M. C.; CRUZ, A. G. da. Benefícios conferidos à saúde através do consumo de queijos probióticos. Alimentos: **Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v.2, n.12, 2021.
- SONG, A. A. L.; IN, L. L. A.; SHE E RAHIM, R. A.; A review on *Lactococcus lactis*: From food to factory. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–15, 2017.
- VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 1, p. 6–21, 2015.
- VIEIRRA, A. D. S.; SANTOS, K. M. O. dos; MARTINEZ, R. C. R.; PADILHA, M.; OLIVEIRA, J da S.; SAAD, S. M. I. Efeito da matriz do leite de cabra sobre a sobrevivência de *Lactobacillus paracasei* LPC37 frente às condições gastrintestinais simuladas *in vitro*. 5º Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte - **5º SINCORTE**, João Pessoa, Paraíba, Brasil, 2011.
- WU, D.T.; NIE, X.R.; SHEN, D. D.; LI. H. Y.; ZHAO, L.; ZHANG, Q.; LIN, D. R.; QIN, W.; Compostos fenólicos, atividades antioxidantes, e efeitos inibitórios sobre enzimas digestivas de diferentes cultivares de quiabo (*Abelmoschus esculentus*). **Moléculas**, v. 25, n. 6, pág. 1276, 2020.