

# SIMULAÇÃO DO SISTEMA GASTRINTESTINAL HUMANO PARA AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE PROBIÓTICO EM QUEIJO DE COALHO COM LEITE DE CABRA

GUSTAVO DE M. CHAVES<sup>1</sup>; ALCINA M. LISERRE<sup>2</sup>, PATRÍCIA B. ZACARCHENCO<sup>3</sup>,  
KARINA M. O. DOS SANTOS<sup>4</sup>, IZILDINHA MORENO<sup>3</sup>

Nº 0901042

## Resumo

Neste projeto, foram produzidos queijos com leite de cabra e probióticos para avaliação da resistência desses microrganismos à passagem pelo trato gastrointestinal simulado. Os queijos foram adicionados de *Lactobacillus acidophilus* e após 15 e 30 dias de estocagem refrigerada, amostras do queijo foram avaliadas para quantificação de *L. acidophilus* e sobrevivência dos probióticos à passagem simulada pelo sistema gastrointestinal humano. O suco gástrico com pH 2,5 foi adicionado de pepsina (3g/L). O suco entérico, com a adição de bile (3g/L), foi simulado com pH 5,6 e 7,5, de acordo com as condições do sistema intestinal humano. As contagens totais de *L. acidophilus* para o queijo após 15 e 30 dias foram semelhantes, 7,03 e 7,04 logUFC/g, respectivamente. Considerando para consumo porção diária de 30g de queijo, obtém-se um total de 10<sup>8</sup> células, o que atende às exigências da legislação brasileira para alimentos com alegações funcionais. Após o ensaio em condições simuladas do sistema gastrointestinal, as populações de bifidobactérias foram reduzidas a 3,79 e 4,33 logUFC/g para os queijos com 15 e 30 dias, respectivamente. Conclui-se que as contagens do probiótico após ação de suco gástrico e entérico formulados com pepsina e bile foram reduzidas em aproximadamente 3 ciclos logarítmicos, apesar da contagem inicial do queijo estar de acordo com a legislação brasileira.

**Palavras-chave:** probiótico, queijo de leite de cabra, *Lactobacillus acidophilus*, suco gástrico, suco entérico

## Summary

In this study, goat milk cheeses with probiotic were produced and the survival of these bacteria after simulated conditions of human gastrointestinal tract was evaluated. The

---

<sup>1</sup> Bolsista CNPq: Graduação em Biologia, UNICAMP, Campinas-SP, vitorwilson@hotmail.com

<sup>2</sup> Orientador: Pesquisador, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP, pblumer@ital.sp.gov.br

<sup>3</sup> Colaborador: Pesquisador, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP

<sup>4</sup> Colaborador: Pesquisador, EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS, Sobral-CE

cheeses were added of *Lactobacillus acidophilus* and evaluated after 15 and 30 days of refrigerated storage. The gastric juice at pH 2.5 was added of pepsin (3g/L). The enteric juice added of bile (3g/L) was simulated with pH 5.6 and 7.5 according to the conditions of the duodenum, jejunum, ileum, and the large intestine. The counts of *L. acidophilus* were similar in the cheeses kept at 15 and 30 days, respectively 7,03 and 7,04 log CFU/g. These results show that the portion of 30g of cheese contains  $10^8$  cells. These data agree to the Brazilian legislation requirement related to the functional foods. After the assays simulating gastrointestinal conditions, the population of *L. acidophilus* were reduced to 3,79 and 4,33 log CFU/g in the cheese after 15 and 30 days of storage, respectively. It was observed that the population of probiotics after simulated conditions of gastric and enteric juices formulated with pepsin and bile, respectively, was reduced in approximately three logarithmic cycles, despite the initial counts attend to the brazilian legislation requirements.

**Key words:** probiotic, goat milk cheese, *Lactobacillus acidophilus*, gastric juice, enteric juice

## 1. Introdução

A incorporação de atributos de saúde adicionais aos alimentos é uma oportunidade de negócio, devido à expansão do mercado de alimentos funcionais e ao alto valor agregado desses produtos. No segmento de funcionais, a adição de probióticos é importante inovação no desenvolvimento de novos produtos. A introdução de culturas probióticas em queijos os coloca como veículos promissores desses microrganismos. Comparando aos leites fermentados, os queijos apresentam características físico-químicas que favorecem a manutenção da viabilidade dos probióticos: pH mais alto, menor conteúdo de oxigênio e maior estabilidade do meio na estocagem (BOYLSTON *et al.* 2004). A legislação brasileira reconhece vários probióticos e, entre eles, o *L. acidophilus* (BRASIL 2008). É autorizada a inserção de alegações de efeito sobre a saúde na rotulagem de produtos que apresentam concentrações superiores a  $10^8$  células por porção diária de consumo até o final de seu prazo de validade. Desenvolver um queijo probiótico depende, portanto, da garantia da viabilidade dos probióticos no processamento, maturação e estocagem (STANTON *et al.* 2001). Por isto, é importante monitorar a contagem das bactérias e demais características do produto. Deve-se considerar também que o efeito dos probióticos está diretamente relacionado com a sua atividade no trato digestivo, e esta depende de sua sobrevivência nesse ambiente, por isso essas bactérias devem ser resistentes aos processos fisiológicos e físico-químicos do trato gastrointestinal (GI). O

desenvolvimento de queijo potencialmente probiótico a partir de leite de cabra justifica-se em função do potencial de mercado, do alto valor agregado atribuído aos alimentos funcionais e da possibilidade de inserção de produtos lácteos caprinos nesse segmento.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* em queijos de leite de cabra tipo “de coalho”, sob condições que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal humano, após 15 e 30 dias de estocagem sob refrigeração.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Produção dos queijos de cabra experimentais e contagem de *Lactobacillus acidophilus***

O processamento dos queijos de cabra foi realizado na usina de processamento de leite da Embrapa Caprinos. O probiótico usado foi *L. acidophilus* (DVS, Chr. Hansen). Ao leite pasteurizado adicionou-se cloreto de cálcio (0,02% de solução 50%), fermento láctico mesofílico (R-704 DVS, Chr. Hansen), *L. acidophilus* (Chr. Hansen) e coagulante. O coágulo foi cortado, submetido a agitação e repouso alternados para dessoragem, até que grãos ficassem firmes. Cerca de 50% do soro foi retirado, aquecido a 60°C e retornado ao tanque de forma a atingir 45°C. A massa recebeu adição de sal (0,8%), e a prensagem por 12 horas. Os queijos foram embalados a vácuo e estocados por 30 dias a 10°C. As análises para contagem de *L. acidophilus* foram realizadas em triplicata. Porções de queijo com 15 e 30 dias foram homogenizadas em água peptonada 0,1% e submetidas a diluições decimais. A contagem de *L. acidophilus* nas amostras dos queijos foi feita em meio MRS-IM, após incubação em aerobiose a 43°C por 72h (BURITI, 2005).

### **2.2. Avaliação da sobrevivência de bactérias probióticas no queijo de coalho após ação de suco gástrico e entérico formulados com pepsina e bile**

A sobrevivência de *L. acidophilus* no queijo foi avaliada em sucos gástrico e entérico simulados após 15 e 30 dias de armazenamento, utilizando-se enzimas do trato gastrointestinal segundo metodologia modificada de Sallans *et al.* (1988). O queijo dissolvido em água peptonada 0,1% foi adicionado à solução ácida pH 2,5, contendo pepsina (3g/L), e incubado a 37°C em *shaker* por 120 min com agitação de 150 rpm. Em seguida, o pH foi alterado para 5,6 por mais 120 minutos e, finalmente, alterado

para pH 7,5 pelos últimos 120 minutos. Nas etapas de simulação dos fluidos entéricos também adicionou-se bile (Oxoid) na proporção de 3g/L. O experimento totalizou 6 horas de ensaio (120 min para cada pH). Para cada tratamento foram realizadas três repetições. A contagem de *L. acidophilus* foi realizada conforme item 2.1.

### 3. Resultados e Discussão

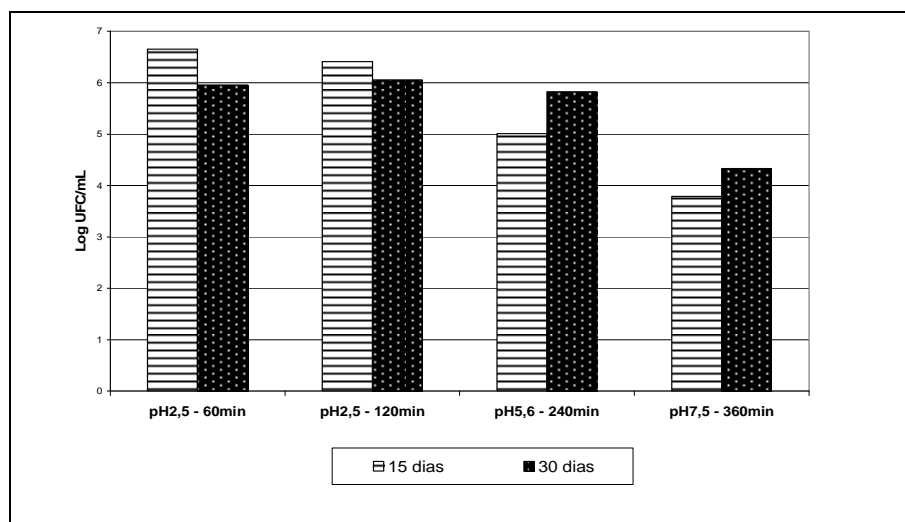
As populações de *L. acidophilus* nos queijos de cabra armazenados por 15 e 30 dias foram similares, de 7,03 e 7,04 log UFC/g, respectivamente. Considerando para consumo uma porção diária de aproximadamente 10g a 100g de queijo, obtém-se um total de  $10^8$ - $10^9$  células, o que está de acordo com as exigências da legislação brasileira para alimentos com alegações funcionais (BRASIL 2008). Considerando ainda, que pela rotulagem do produto indica-se uma porção diária de 30g, mesmo com um consumo menor, de 10g, ainda será obtida a concentração mínima de microrganismos para a manutenção do efeito probiótico. As contagens de populações sobreviventes à passagem pelo sistema gastrointestinal podem ser observadas na Figura 1. Nota-se que após 60 min em solução gástrica com pH 2,5 e pepsina (3g/L), obteve-se contagens de 6,65 e 5,96 logUFC/g para os queijos com 15 e 30 dias, respectivamente. Após 120 min de ensaio em suco gástrico a população em queijo com 15 dias foi reduzida em aproximadamente 0,62 ciclos logarítmicos, enquanto que a população no queijo com 30 dias foi reduzida em 0,98 ciclos logarítmicos.

Com o início do ensaio nos sucos entéricos após a passagem pelo suco gástrico, obteve-se contagens de 5,01 e 5,83 log UFC/g após duas horas em pH 5,6 e de 3,79 e 4,33 logUFC/g após 2 horas em pH 7,5, para os queijos com 15 e 30 dias de estocagem, respectivamente. A etapa com pH 5,6 simula a entrada do alimento no duodeno enquanto a etapa com pH 7,5 simula a passagem para o jejuno, íleo e intestino grosso. Considerando as populações iniciais de bifidobactérias nos queijos, houve uma redução de até 3,24 e 2,71 ciclos logarítmicos após o ensaio de simulação da passagem pelo trato gastrointestinal para os queijos com 15 e 30 dias, respectivamente. Segundo Kurmann e Rasic (1991), a sobrevivência de  $10^6$  UFC/g é suficiente para exercer os efeitos benéficos à saúde, o que comprova que o queijo apresentou população final adequada para a veiculação de probióticos após a simulação do sistema gástrico, o que não ocorreu após a simulação do sistema intestinal. Estudos posteriores ainda devem ser realizados, pois poucos são os trabalhos que alegam qual é a população mínima para o efeito probiótico após a

passagem pelos sistemas simulados, e também deve-se considerar que a contagem total de lactobacilos nestas amostras antes dos testes *in vitro* estava de acordo com a legislação brasileira para alimentos funcionais (BRASIL, 2008). Atualmente, a legislação brasileira exige que as culturas utilizadas em alimentos funcionais sejam resistentes às condições gástricas e à presença de bile, mas não especifica qual a redução máxima aceitável após a realização destes testes. Diversos autores relatam que as bactérias probióticas são sensíveis a acidez e a bile em maior ou menor grau em função do gênero e espécie, sendo raras as que sobrevivem integralmente após os testes simulados com sucos gástricos e entéricos (TRUELSTRUP HANSEN *et al.*, 2002; TAKAHASHI *et al.*, 2004; COLLADO *et al.*, 2006).

#### 4. Conclusões

A fabricação de queijo de leite de cabra com *L. acidophilus* é viável tecnologicamente, com a obtenção de contagens acima de 7 log UFC/g por até 30 dias de estocagem. Os lactobacilos resistiram parcialmente à passagem simulada pelo trato gastrointestinal humano com uma redução de até 3,24 ciclos logarítmicos, principalmente após a simulação do suco entérico com sais de bile.



**Figura 1.** Sobrevivência de *L. acidophilus* em queijo de cabra armazenado sob refrigeração por 15 e 30 dias após simulação do suco gástrico (pH 2,5 por 120 min) e entérico (pH 5,6/240min e pH 7,5/360min).

#### 5. Agradecimentos

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pelo auxílio financeiro ao projeto.

#### 6. Referências Bibliográficas

1. BOYLSTON, T.D., VINDEROLA, C.G., GHODDUSI, H.B., REINHEIMER, J.A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. **Int. Dairy J.** v.14, p.375-387, 2004.
2. BRASIL. ANVISA. **VIII - Lista das Alegações Aprovadas**. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm>. Acesso em 15 mai. 2009.
3. BURITI, F.C.A. **Desenvolvimento de queijo fresco cremoso simbiótico**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP, São Paulo, 2005.
4. COLLADO, M. C., MERILUOTO, J., SALMINEN, S. In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. **Food Research International**. v.15 n.4, p.570-575, 2006.
5. KURMANN, J. A., RASIC, J. L., **The health potential of products containing bifidobacteria**. In R. K. Robinson (Ed.), Therapeutic properties of fermented milks (pp.117-158), 1991. London, UK. Elsevier.
6. SALLANS, F. RODRIGUEZ, F., SABLAYROLLES, B., COMBES, A., PATAU, J.P., ROUFFIAC. R. Etude comparative de cinq specialties de théophylline a liberation prolongée. **Journal de Pharmacie Belgique** 43:81-87. 1988.
7. STANTON, C., GARDINER, G., MEEHAN, H., COLLINS, K., FITZGERALD, G., BRENDAN LYNCH, P., ROSS, R.P. Market potential for probiotics. **Am. J. Clinical Nutrition** v.73, p.476-483, 2001.
8. TAKAHASHI, N., XIAO, J. Z., MIYAJI, K., YAESHIIMA, T., HIRAMATSU, A., IWATSUKI, K.,. Selection of acid tolerance of bifidobacteria and evidence for a low -pH-inducible and acid tolerance response in *Bifidobacterium longum*. **Journal of Dairy research**, 71, 340-345, 2004.
9. TRUDELSTRUP HANSEN, L., ALLAN-WOJTAS, P. M., JIN, Y. L., PAULSON, A. T., Survival of Ca-Alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. And simulated gastrointestinal conditions. **Journal of food microbiology**, 19, 35-45, 2002.