



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

## ***Lactobacillus rhamnosus* EM BEBIDA LÁCTEA CAPRINA COM SUCO DE UVA: SOBREVIVÊNCIA A CONDIÇÕES GASTRINTESTINAIS SIMULADAS *IN VITRO***

K. M. O dos Santos<sup>1</sup>, I.C. Oliveira<sup>2</sup>, L.F. da Silva<sup>3</sup>, F.C.A. Buriti<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Embrapa Agroindústria de Alimentos, Avenida das Américas, 29501, CEP: 23020-470 – Rio de Janeiro RJ – Brasil, Telefone: (21) 3622-9600 – Fax: (21) 3622-9713, e-mail: karina.dos-santos@embrapa.br

<sup>2</sup> Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará - Campus Sobral, CEP: 62042-030 – Sobral CE – Brasil, Telefone: (88) 3112-7400 – Fax: (88) 3112-7455, e-mail: oliveira\_isabelcristina@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Embrapa Caprinos e Ovinos, Estrada Sobral-Groairas km 4, CEP: 62010-970 – Sobral CE – Brasil, Telefone: (88) 3622-9600 – Fax: (21) 3622-9713, liana.ferreira@embrapa.br

<sup>4</sup> Universidade Estadual da Paraíba, Departamento de Farmácia, Rua Juvêncio Arruda s/n – CEP: 58429-500 – Campina Grande PB – Brasil, Telefone: (83) 3315-3360 – Fax: (83) 3315-3352, flaviaca0123@gmail.com

**RESUMO** – A resistência a condições do trato gastrointestinal (TGI) simuladas *in vitro* da cepa nativa *Lactobacillus rhamnosus* EM1127 (*Lr*-EM1127), potencialmente probiótica, em bebida láctea caprina fermentada com suco de uva, foi investigada em comparação com cultura probiótica comercial da mesma espécie (*Lr*-32). A acidez titulável e o pH das bebidas foram monitorados durante 28 dias de armazenamento refrigerado a  $6 \pm 2$  °C, registrando-se gradual aumento da acidez e redução do pH no período. Nos ensaios de digestão *in vitro* das bebidas observou-se queda de 3,80 e 3,27 log UFC/mL na população de *Lr*-EM1127, respectivamente, no primeiro e aos 28 dias. Queda mais acentuada foi registrada para *Lr*-32, de 5,03 e 5,42 log UFC/mL, respectivamente, nos mesmos períodos. A sobrevivência de *Lr*-EM1127 na bebida láctea caprina às condições do TGI *in vitro* foi superior à da cepa comercial. O produto mostrou ser um veículo adequado para a cepa potencialmente probiótica *Lr*-EM1127.

**ABSTRACT** – The resistance to the *in vitro* simulated gastrointestinal (GIT) conditions of an indigenous potentially probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* (*Lr*-EM1107) incorporated to a fermented goat dairy beverage with grape juice was investigated in comparison with a commercial probiotic culture (*Lr*-32). Titratable acidity and pH of the beverages were measured during 28 days of cold storage ( $6 \pm 2$  °C), being registered a gradual increase and decline, respectively, for both beverages. A decrease of 3.80 and 3.27 log cfu/mL in *Lr*-EM1127 population was observed during the *in vitro* digestion assay of the beverage at first and 28 days, respectively. A higher decline was registered for *Lr*-32, 5.03 and 5.42 cfu/mL, respectively, in the same periods. The indigenous strain *Lr*-EM1127 incorporated to the goat dairy beverage with grape juice survived better to GIT conditions *in vitro*, compared with the commercial strain. The product showed to be a suitable vehicle for *Lr*-EM1127.

**PALAVRAS-CHAVE:** alimentos probióticos; leite de cabra; bactérias lácticas nativas; resistência gastrointestinal *in vitro*.

**KEYWORDS:** probiotic foods; goat milk; wild lactic acid bacteria; *in vitro* gastrointestinal resistance.



## 1. INTRODUÇÃO

A produção de leite de cabra e produtos lácteos caprinos está em expansão no Brasil. O valor nutricional, o baixo potencial alergênico e a elevada digestibilidade do leite de cabra (Haenlein, 2004) o tornam um alimento promissor para a elaboração de produtos lácteos funcionais. O desenvolvimento de alimentos probióticos constitui alternativa relevante para agregação de novas funcionalidades ao leite caprino e ampliação de seu mercado.

Uma alta concentração de células viáveis no alimento, superior a  $10^6$  UFC / mL, é considerada necessária para obtenção dos efeitos benéficos dos probióticos. No entanto, a viabilidade elevada não garante a sobrevivência do microrganismo durante a passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) até a chegada ao intestino, local de sua atuação. A matriz alimentícia na qual o probiótico foi incorporado pode exercer papel relevante em sua proteção durante a passagem pelo TGI. Em função disso, a viabilidade do probiótico na matriz do produto também deve ser investigada após exposição a condições do TGI, complementando a avaliação do potencial probiótico do produto (Buriti et al., 2010). A avaliação da tolerância ao TGI também pode contribuir para a seleção das cepas mais adequadas para incorporação a um determinado produto alimentício, visando favorecer a ação do probiótico ao nível intestinal

*Lactobacillus rhamnosus*, espécie do grupo *Lactobacillus casei*, apresenta diversas cepas com propriedades associadas à benefícios à saúde e empregadas como probióticos em alimentos industrializados. A espécie manifesta comportamento associativo com *Streptococcus thermophilus* na fermentação do leite, contribuindo para a geração do aroma característico de lácteos fermentados (Oliveira et al., 2012). Pesquisas da Embrapa com bactérias lácticas isoladas de queijos artesanais resultaram na seleção de cepas de *Lb. rhamnosus* potencialmente probióticas e com aptidão tecnológica para uso em produtos lácteos (dos Santos et al., 2014).

O desenvolvimento de bebida láctea probiótica a partir de leite e soro lácteo caprinos e suco de uva tem o potencial de congregar diversos benefícios à saúde do consumidor. O soro lácteo oriundo da produção de queijos contém proteínas de alto valor biológico, bem como outros nutrientes que o tornam um coproduto de interesse para uso na alimentação humana. O suco de uva, além de contribuir para o sabor do produto, contém teor relevante de polifenóis associados a numerosos efeitos promotores de saúde.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a sobrevivência da cepa nativa potencialmente probiótica *Lb. rhamnosus* EM1127 em bebida láctea à base de leite e soro lácteo caprino e suco integral de uva a condições do trato gastrointestinal simuladas *in vitro*, em comparação com a cultura probiótica comercial *Lb. rhamnosus* Lr-32.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Processamento das bebidas lácteas fermentadas

As bebidas lácteas foram produzidas a partir da fermentação de uma base láctea preparada com leite e soro de queijo caprino, produzidos na Embrapa Caprinos e Ovinos, adicionada de suco de uva integral. A mistura de leite (40 g / 100 g) e soro lácteo (33 g / 100 g), adicionada de açúcar (7 g / 100 g), foi submetida a tratamento térmico a 85 °C/15 min, seguido de resfriamento até  $37 \pm 2$  °C. Nessa temperatura as culturas de *Streptococcus thermophilus* (como *starter*) e *Lb. rhamnosus* (comercial ou nativa) foram adicionadas à base láctea, em seguida incubada a 37 °C até atingir pH próximo de 5,0, seguida de resfriamento até  $6 \pm 2$  °C. Após 24 h de estabilização, suco integral de uva foi adicionado à base láctea na proporção de 20 g / 100 g do produto final. As bebidas foram embaladas em garrafas de polietileno de alta densidade com capacidade de 200 ml e armazenadas a  $6 \pm 2$  °C por um período de 28 dias. Três lotes de cada bebida láctea foi produzido, designadas: BL-32 (com a cultura comercial *Lb. rhamnosus* Lr-32) e BL-EM1127 (com cepa a nativa *Lb. rhamnosus* Lr-EM1127).



## 2.2 Análises físico-químicas

Amostras das bebidas lácteas BL-32 e BL-EM1127 foram coletadas no primeiro dia após processamento e aos 14 e 28 dias de armazenamento para a determinação da acidez titulável (Brasil, 2006), expressa em ácido láctico, e do valor de pH, medido em potenciômetro.

## 2.3 Viabilidade de *Lb. rhamnosus* e *S. thermophilus* nas bebidas

A viabilidade de *Lb. rhamnosus* e *S. thermophilus* nas bebidas foi determinada no primeiro dia após processamento e aos 28 dias de armazenamento. Diluições decimais das amostras, coletadas assepticamente, foram preparadas em água peptonada. Para a enumeração de *Lb. rhamnosus*, 1 mL das diluições apropriadas foi semeado em profundidade em ágar MRS acidificado a pH 5,4, seguida de incubação em anaerobiose a 37 °C por 48 h. A enumeração de *S. thermophilus* foi realizada por semeadura em profundidade em ágar M17 adicionado de solução de lactose a 10%, seguida de incubação a 45 °C por 48 h.

## 2.4 Sobrevivência de *Lb. rhamnosus* a condições do TGI simuladas *in vitro*

Amostras das bebidas foram coletadas no primeiro e aos 28 dias de estocagem refrigerada para avaliação da sobrevivência das cepas de *Lb. rhamnosus* a condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, segundo metodologia descrita por Buriti et al. (2010). Diluição decimal das amostras foi preparada com solução salina e, para a simulação da fase gástrica, o pH foi reduzido a 2,5 com solução de HCl 1 M e foram adicionadas soluções de pepsina e lipase até atingir concentração de 3,0 g/l e 0,9 g/l, respectivamente. Os frascos foram incubados a 37 °C por 2 h sob agitação (150 rpm). Subsequentemente, as condições entéricas foram simuladas em duas fases. Na primeira, o pH foi elevado a 5,0 com solução alcalina estéril e foram adicionadas bile bovina e pancreatina até a concentração de 10 g/l e 1 g/l, respectivamente. Após duas horas de incubação, o pH foi ajustado a 7,0 e as concentrações de bile e pancreatina foram ajustadas, respectivamente, a 10 g/l e 1 g/l na simulação da segunda fase entérica, seguida de duas horas adicionais de incubação. Os valores de pH foram monitorados em cada etapa de avaliação de resistência às condições gastrintestinais.

Amostras foram coletadas no início (T0) do ensaio, após a fase gástrica (T1) e ao final do ensaio, após as fases entéricas (T2) para a enumeração de *Lb. rhamnosus*. Diluições decimais em série das amostras foram preparadas em água peptonada, sendo 1 mL de cada diluição semeado em profundidade em ágar MRS acidificado a pH 5,4, seguida de incubação em anaerobiose a 37 °C por 48 h.

A taxa de sobrevivência (TS%) foi calculada segundo Wang et al. (2009) com base nas populações iniciais e finais, para estimar a resistência relativa das cepas de *Lb. rhamnosus* após o processamento da bebida (dia 1) e ao final do período de armazenamento estudado (28 dias).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de pH e acidez titulável das bebidas lácteas BL-32 e BL-EM1127 estão apresentados na Tabela 1. Foi registrada redução gradual nos valores de pH de ambas as bebidas durante os 28 dias de armazenamento refrigerado e, paralelamente, observou-se um aumento gradual da acidez titulável nesse período.

As populações de *Lb. rhamnosus* nas bebidas BL-32 e BL-EM1127 mantiveram-se acima de 7,6 log UFC/mL durante os 28 dias de armazenamento e as de *S. thermophilus* permaneceram próximas de 9,0 log UFC/mL no mesmo período.



Tabela 1. Acidez titulável e pH das bebidas lácteas BL-32 (com a cepa *Lr*-32) e BL-EM1127 (com a cepa *Lr*-EM1127) durante armazenamento a  $6 \pm 2$  °C.

Tratamento	Tempo (dias)	Acidez titulável (g/100g)	pH
BL-32	1	$0,62 \pm 0,00$	$3,75 \pm 0,01$
	14	$0,68 \pm 0,01$	$3,70 \pm 0,01$
	28	$0,73 \pm 0,01$	$3,62 \pm 0,01$
BL-EM1127	1	$0,66 \pm 0,01$	$3,65 \pm 0,03$
	14	$0,70 \pm 0,03$	$3,59 \pm 0,01$
	28	$0,84 \pm 0,01$	$3,50 \pm 0,02$

A Tabela 2 apresenta os resultados dos ensaios de sobrevivência às condições do TGI simuladas *in vitro*. No primeiro dia após o processamento (dia 1), as populações de *Lb. rhamnosus* nas bebidas lácteas BL-32 e BL-EM1127 estavam próximas de 8 log UFC/mL ao início dos ensaios (T0). Após a simulação da fase gástrica do processo digestivo (T1), a população de *Lr*-1127 foi reduzida em 3,46 log UFC/mL, em média, enquanto uma queda de 5,18 log UFC/mL foi registrada para a cepa *Lr*-32. A mesma tendência de queda foi observada aos 28 dias das bebidas, sendo, no entanto, menor no caso da *Lr*-EM1127. Durante a fase entérica do ensaio de sobrevivência, a população de *Lr*-1127 na bebida recém processada (dia 1) apresentou uma ligeira queda (0,25 log UFC/mL), mantendo-se praticamente estável nessa fase para a bebida aos 28 dias. Inversamente, observou-se uma pequena recuperação da população de *Lr*-32 após a exposição da bebida recém processada ao fluido entérico e uma queda menor no caso da bebida aos 28 dias de armazenamento.

Considerando o ensaio de digestão *in vitro* como um todo, a queda na população de *Lr*-1127 na matriz da bebida láctea caprina com suco de uva foi de 3,80 e 3,27 log UFC/mL, respectivamente, no primeiro dia e aos 28 dias de armazenamento, resultando em uma taxa de sobrevivência (TS) superior a 50% e próxima de 60% ao final do período estudado. Uma queda mais acentuada foi registrada para a cultura *Lr*-32, de 5,03 e 5,42 log UFC/mL, respectivamente, nos dois períodos de armazenamento da bebida, refletindo em uma menor taxa de sobrevivência.

Tabela 2. Sobrevivência de *Lb. rhamnosus* às condições do TGI simuladas *in vitro* na matriz das bebidas lácteas caprinas BL-32 (com a cepa *Lr*-32) e BL-EM1127 (com a cepa *Lr*-EM1127) após 1 e 28 dias de armazenamento a  $6 \pm 2$  °C.

Tratamento	Tempo de armazenamento (dias)	<i>Lb. rhamnosus</i> (log UFC/g)			
		Tempo inicial (T0)	Fase gástrica (T1)	Fase entérica (T2)	Taxa de sobrevivência (%)
BL-32	1	$7,63 \pm 0,09$	$2,45 \pm 0,13$	$2,60 \pm 0,32$	34,1
	28	$7,98 \pm 0,14$	$2,78 \pm 0,26$	$2,57 \pm 0,05$	32,1
BL-EM1127	1	$7,96 \pm 0,03$	$4,50 \pm 0,22$	$4,16 \pm 0,32$	52,2
	28	$8,16 \pm 0,14$	$4,97 \pm 0,25$	$4,89 \pm 0,07$	59,9



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

Em conjunto, os resultados dos ensaios de digestão *in vitro* evidenciaram o efeito relevante da fase gástrica na sobrevivência das culturas de *Lb. rhamnosus* incorporadas à matriz da bebida láctea com suco de uva, em especial da cultura probiótica de *Lb. rhamnosus* comercialmente disponível. A secreção gástrica, contendo HCl e pepsina, representa um dos principais mecanismos de defesa do organismo humano contra a ingestão de microrganismos. Poucas bactérias lácticas conseguem resistir à passagem gástrica (Cotter & Hill, 2003) e a resistência a essa etapa do processo digestivo é uma propriedade relevante para bactérias probióticas. Nesta etapa, a cepa nativa *Lr-EM1127* destacou-se pela maior tolerância ao baixo pH e demais componentes do fluido gástrico. Em contrapartida, ambas as cepas de *Lb. rhamnosus* mostraram-se resistentes à etapa entérica do ensaio, apresentando menor redução no número de células viáveis em comparação à fase gástrica após a exposição ao fluido entérico simulado, contendo sais biliares, lipases e outras enzimas em concentrações similares à do TGI humano. Embora o pH mais elevado prevalente no intestino delgado seja mais favorável à sobrevivência, a bile é um agente de estresse para bactérias, podendo exercer efeito deletério sobre os fosfolipídios e proteínas da membrana celular, especialmente de Gram-positivas. Uma boa tolerância à bile é importante para bactérias probióticas, que devem permanecer viáveis no intestino, principal *locus* das atividades promotoras de saúde dos probióticos, tem sido utilizada como critério para a seleção de cepas candidatas a probióticos. É uma característica que depende da linhagem, não sendo possível generalizar para o nível de espécie (Begley et al., 2005).

Adicionalmente, os resultados sugerem que a cepa *Lr-EM1127* adaptou-se ao ambiente proporcionado pela matriz da bebida ao longo do armazenamento pois foi verificado um aumento da sobrevivência da cepa à fase gástrica e ao ensaio como um todo na bebida aos 28 dias, em comparação com o primeiro dia após processamento. Resultados semelhantes foram obtidos por Buriti et al. (2010) ao investigar a sobrevivência de *Lb. acidophilus* em mousse de goiaba, evidenciando um aumento na taxa de sobrevivência após estocagem sob congelamento. Os autores consideraram que a exposição prévia do probiótico a fatores de estresse, como baixa temperatura e pH, resulta em aumento da resistência subsequente a um ambiente desfavorável como as condições gastrintestinais.

## 4. CONCLUSÕES

A bebida láctea fermentada caprina com suco de uva mostrou ser um veículo adequado para a cepa potencialmente probiótica *Lb. rhamnosus* EM 1127. A cepa nativa manteve-se viável no produto durante o período de armazenamento estudado e apresentou, nessa matriz, boa resistência às condições do TGI simuladas *in vitro* em comparação com uma cultura probiótica comercial da mesma espécie.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pelo auxílio financeiro e à empresa DuPont™ Danisco® pelo fornecimento de parte dos materiais utilizados neste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G. M. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1729–1738.



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2006). Instrução Normativa nº 68 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. Diário Oficial da União, Brasília, 14 dez. 2006.

Buriti, F. C. A., Castro, I. A., & Saad, S. M. I. (2010). Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 121-129.

Cardarelli, H. R., Buriti, F. C. A., Castro, I. A., & Saad, S. M. I. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese (2008). *LWT - Food Science and Technology*, 41(6), 1037-1046.

Cotter, P. D., & Hill, C. (2003). Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 67, 429-453.

dos Santos, K. M. O., Vieira, A. D. S., Buriti, F. C. A., Nascimento, J. C. F., Melo, M. E. S., Bruno, L. M., Borges, M. F., Rocha, C. R. C., Souza Lopes, A. C., Franco, B. D. G. M., & Todorov, S. D. (2015). Artisanal Coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Dairy Science and Technology*. 95, 209 – 230.

Haenlein, G.F.W. (2004). Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*, 51(2), 155-163.

Oliveira, M. N., Sodini, I., Remeuf, F., & Corrieu. G. (2001). Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 11(11), 935-942.

de Souza Oliveira, R. P., Perego, P., de Oliveira, M. N., & Converti, A. (2012). Effect of inulin on the growth and metabolism of a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. *LWT-Food Science and Technology*, 47(2), 358-363.

Wang, J., Guo, Z., Zhang, Q., Yan, L., Chen, W., Liu, X.-M., & Zhang, H.-P. (2009). Fermentation characteristics and transit tolerance of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang in soymilk and bovine milk during storage. *Journal of Dairy Science*, 92(6), 2468-2476.