



RESISTÊNCIA DE CEPAS DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* A CONDIÇÕES DO TRATO GASTROINTESTINAL E SAIS BILIARES HUMANO SIMULADAS *IN VITRO*

Moraes GMD¹, Egito AS², Matos CR³, Barcelos SC¹, Santos KMOD⁴

¹Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Ceará - IFCE - Campus Sobral., ²Embrapa Caprinos e Ovinos, Fazenda Tres Lagoas, Sobral-Ce., ³Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA, Sobral-Ce., ⁴Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro - RJ.

Introdução

A crescente busca da população por hábitos alimentares mais saudáveis e que proporcionem efeitos benéficos a saúde, tem aumentado nos últimos anos, elevando dessa forma o consumo e a prospecção por novas cepas que possuam potencial probiótico.

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, afetam positivamente a saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). Diversas cepas de *Lactobacillus plantarum*, que tem uma longa história de ocorrência natural e de utilização segura numa variedade de produtos alimentares, apresentam propriedades probióticas, e estudos clínicos tem demonstrado estas características desejáveis para a sua utilização em seres humanos (Vries et al., 2006).

Entre as propriedades de interesse encontradas em bactérias lácticas e que podem fundamentar sua classificação como microrganismos probióticos estão a capacidade de inibir patógenos intestinais via exclusão competitiva ou produção de substâncias antimicrobianas (bacteriocinas), bem como a produção de enzimas que auxiliam na digestão de lactose e na desconjugação de sais biliares, contribuindo para a redução dos níveis séricos de colesterol (Vinderola et al., 2008). No entanto, para que essa cepa possa exercer essas funções no organismo do consumidor, é necessário que seja capaz de sobreviver às condições adversas do trato gastrointestinal do hospedeiro.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a sobrevivência de 9 cepas de *Lactobacillus plantarum* isoladas de leite caprino após exposição a condições do trato gastrointestinal (TGI) e sais biliares humano simuladas *in vitro*.



Material e Métodos

Avaliação da resistência a condições do TGI simuladas *in vitro*

A tolerância ao trânsito gastrointestinal (TGI) foi avaliada *in vitro* por método adaptado de Charteris et al. (1998) e Jensen (2012). A viabilidade das bactérias foi determinada no início do experimento (tempo 0 min) a partir da suspensão bacteriana contendo 10^8 UFC (unidades formadoras de colônia)/ml e após exposição ao fluido gástrico (90 min) e entérico (240 min) simulados. Para a enumeração bacteriana foram preparadas diluições seriadas em solução salina a 0,85% w/v estéril e o plaqueamento foi realizado por semeadura em superfície em MRS ágar (Oxoid, Basingstoke, UK) de 100 μ l das diluições seriadas adequadas. Para simular o suco gástrico foi dissolvido 2g/l de pepsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) em solução salina 0,5% w/v estéril, e o pH ajustado para 2,5 com HCl a 1M, seguido de incubação a 37°C por 90 min. Para simulação das condições intestinais foi dissolvido 250mg/l de pancreatina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SA) e 0,45% de extrato de bile (Oxgall, Merck, Darmstadt, Germany), em solução salina 0,5% w/v estéril e o pH ajustado para 7,0 com NaHCO₃, seguido de incubação a 37°C por 240 min. Todas as soluções foram preparadas no dia do experimento. Para estimar a resistência relativa de cada cepa às condições do TGI, foi calculado um índice de sobrevivência, com base na população inicial (tempo 0) e final, após 90min na simulação das condições gástricas e 240min nas condições entéricas. O experimento foi realizado em triplicata com duas repetições.

Desconjugação de sais biliares

Para avaliar a capacidade de desconjugar sais biliares, as nove cepas de *L. plantarum* foram estriadas em placas contendo MRS ágar acrescido de 0,5% (p/v) dos sais sódicos do ácido taurocólico (TC), taurodesoxicólico (TDC), glicocólico (GC) ou glicodesoxicólico (GDC), (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA). As placas foram incubadas em anaerobiose (GasPack System, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK), a 37°C por 72h. A presença de um halo opaco em volta das colônias foi considerado positiva para a desconjugação de sais biliares. O teste foi realizado em duas repetições, em duplicata.

Resultados e Discussão

Avaliação da resistência a condições do TGI simulado *in vitro*

A secreção gástrica constitui o primeiro mecanismo de defesa do organismo humano contra os micro-organismos ingeridos oralmente, e a resistência a essas condições é uma propriedade rara entre as bactérias lácticas



(Cotter & Hill, 2003). Desta forma, a capacidade de sobreviver à passagem pelo TGI é uma importante propriedade na seleção de micro-organismos com potencial probiótico. As condições gástricas de pH variam de pH 1, durante o jejum, passando para pH 4,5, após a refeição, e a digestão pode durar 3h (Maragkoudakis et al., 2006).

Os valores obtidos para o índice de sobrevivência das cepas de *L. plantarum* ao fluido gástrico simulado a pH 2,5 e entérico a pH 7,0, são apresentados na tabela 1. O grupo de nove cepas de *L. plantarum* apresentou reduções populacionais que variaram de 4,05 log UFC/ml a 5,37 log UFC/ml, sendo a sobrevivência das cepas à fase gástrica considerada baixa, pois apenas as cepas *L. plantarum* CNPC024 e CNPC036 apresentaram índice de sobrevivência superior a 50%. Na etapa entérica, este índice permaneceu entre 67 e 100% para as 9 cepas. Em trabalho realizado por Iñiguez-Palomares et al. (2007), um índice de sobrevivência superior a 45% foi considerado relevante na seleção de cepas com potencial probiótico.

Desconjugação de sais biliares

Assim como a capacidade de sobreviver às condições do TGI, a resistência aos sais biliares e a presença de hidrolases de sais biliares são características relevantes na seleção de cepas potencialmente probióticas. A produção de hidrolases de sais biliares e sua liberação no organismo humano, pode contribuir para redução do colesterol circulante, pois os ácidos biliares desconjugados são menos solúveis e menos absorvidos no lúmen intestinal, sendo excretados nas fezes. A presença dessa enzima também é sugerida como mecanismo de defesa dos lactobacilos, favorecendo sua sobrevivência às condições de estresse geradas pela presença de bile no intestino, já que esta enzima funciona como um detergente (De Smet et al., 1995).

Os resultados são apresentados na tabela 1. As nove cepas de *Lactobacillus plantarum* estudadas demonstraram boa sobrevivência na presença dos sais sódicos dos ácidos GC e TC, embora não tenham demonstrado capacidade de desconjugá-los. Três das cepas de *L. plantarum* não sobreviveram à presença do sal sódico do ácido GDC, no entanto as demais seis cepas não somente resistiram, mas desconjugaram fortemente este sal. Todas as cepas sobreviveram à presença do sal sódico do ácido TCD, sendo que as cepas CNPC011, CNPC024, CNPC027 e CNPC032 o desconjugaram fortemente.



Tabela 1 – Sobrevivência as condições gastrointestinais e desconjugação de sais biliares.

Micro-organismos/Cepas	Viabilidade (log ufc/ml) durante a simulação a tolerância ao suco gástrico			Viabilidade (log ufc/ml) durante a simulação ao trânsito intestinal			Desconjugação de sais biliares 0,5%			
	0 min	90min	Í. Sobrev.	0 min	120min	Í. Sobrev.	GDC	GC	TDC	TC
<i>Lactobacillus plantarum</i>										
CNPC 011	8,39±0.04	3,71±0.02	44,25%	8,39±0.04	8,44±0.01	100,61%	g++	g-	g++	g-
CNPC 020	6,18±0.07	2,13±0.21	34,51%	6,18±0.07	5,05±0.38	81,83%	ng	g-	g-	g-
CNPC 024	8,43±0.03	4,38±0.18	52,01%	8,43±0.03	7,42±0.10	88,10%	g++	g-	g++	g-
CNPC 027	7,91±0.04	2,70±0.14	34,08%	7,91±0.04	5,33±0.05	67,37%	g-	g-	g++	g-
CNPC 032	8,70±0.07	3,96±0.03	45,51%	8,70±0.07	8,41±0.03	96,65%	g++	g-	g++	g-
CNPC 036	8,43±0.03	4,38±0.18	52,01%	8,43±0.03	7,42±0.10	88,10%	ng	g-	g-	g-
CNPC 037	7,80±0.02	3,46±0.05	44,31%	7,80±0.02	7,69±0.08	98,57%	g++	g-	g+	g-
CNPC 038	8,32±0.47	3,94±0.20	47,44%	8,32±0.47	8,02±0.10	96,56%	g++	g-	g-	g-
CNPC 040	7,88±0.06	2,51±0.24	31,85%	7,88±0.06	7,23±0.14	91,78%	ng	g-	g-	g-

Í. Sobrev.= índice de sobrevivência; GDC=ácido glicodesoxicólico; GC=ácido glicocólico;TDC=ácido taurodesoxicólico; TC=ácido taurocólico; ng=não cresceu; g-=cresceu, mas não desconjugou; g+=moderada desconjugação; g++= forte desconjugação.



Conclusão

Os resultados obtidos *in vitro* indicam que as condições gástricas constituem a principal barreira à sobrevivência das cepas de *L. plantarum* estudadas durante a passagem pelo TGI, pois apenas duas cepas apresentaram um índice de sobrevivência superior a 50%.

Praticamente todas as cepas estudadas apresentaram boa resistência à presença de sais biliares, e as cepas *L. plantarum* CNPC 011, CNPC 024 e CNPC 032, destacaram-se pela capacidade de desconjugação dos sais biliares testados.

Com base nestes resultados, a cepa de *L. plantarum* CNPC 024 reúne as melhores características de sobrevivência e desconjugação de sais, mostrando-se promissora para investigação de propriedades probióticas.

Referências

- 1- Charteris, WP., Kelly, PM., Morelli, L., Collins, JK. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*.1998 84:759–768.
- 2- De Smet, I., Van HL., Vande WM., Cristianes, H., Verstraete, W. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*.1995 79:292.301.
- 3- Cotter, PD., Hill, C. Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003 67:429–453.
- 4- FAO/WHO. [Internet]. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. [updated 2001 Oct; cited 2015 Feb,10]. Available from: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf
- 5- Iñiguez-Palomares C., Pérez-Morales R., Acedo-Félix E. Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. *Rev. Latinoamericana Microbiología*.2007 49(3-4): 46-54.



- 6- Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K., Axelsson, L. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 2012 153: 216–222.
- 7- Maragkoudakis, PA., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., Tsakalidou, E.. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal* 2006 16:189–199.
- 8- Vinderola, G. Capellini, B., Villarreal, F., Suarez, V., Quiberoni, A., Reinheimer, J.. Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *LWT - Food Science and Technology*. 2008 41(9):1678-1688.
- 9- Vries, MC., Vaughan, EE., Kleerebezem, M., Vos, WM. *Lactobacillus plantarum*-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*. 2006 16(9) :1018-1028.