



Efeito da matriz do leite de cabra sobre a sobrevivência de *Lactobacillus paracasei* LPC37 frente às condições gastrintestinais simuladas *in vitro*¹

Antônio Diogo Silva Vieira², Karina Maria Olbrich dos Santos³, Rafael Chacon Ruiz Martinez⁴, Marina Padilha²,
Jacqueline da Silva Oliveira⁵, Susana Marta Isay Saad⁶

¹Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Caprinos e Ovinos

²Mestrando(a) em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica pelo Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutico (FBT) pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), São Paulo - SP. E-mail: diogovieira@usp.br e marvypadilha@gmail.com

³Pesquisador(a) da EMBRAPA Caprinos e Ovinos. Sobral - CE. E-mail: karina@cnpc.embrapa.br

⁴Pós-Doutorando pelo Departamento de Alimentação e Nutrição Experimental da FCF-USP, São Paulo - SP. E-mail: rafacrm@hotmail.com

⁵Graduanda em Tecnologia em Alimentos pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - IFCE, Sobral - CE. E-mail: jacquinedasilva1@hotmail.com

⁶Professor(a) do FBT - FCF-USP, São Paulo-SP. E-mail: susaad@usp.br

Resumo: O objetivo desse trabalho foi avaliar se a matriz do leite de cabra confere proteção à cepa probiótica comercial de *Lactobacillus paracasei* LPC 37 (LPC-37) frente às condições gastrintestinais simuladas *in vitro* (TGI). Foram avaliadas culturas frescas de LPC-37 cultivadas em leite de cabra integral e em caldo MRS. A cultura *overnight* de LPC-37 em MRS foi centrifugada e o *pellet* foi ressuspensão em solução de NaCl 0,85% (m/v). As condições do TGI foram simuladas com ajustes de pH que variaram entre 2,10-6,92. As amostras foram incubadas a 37°C durante 6 h sob agitação. Foram utilizados solução de ácido clorídrico (HCl) 1N, pepsina (3 g/L) e lipase (0,9 mg/L) para a simulação da fase gástrica e, para a simulação das fases entérica I e II, foi utilizada solução de fosfato de sódio (pH ~12) contendo bile (10 g/L) e pancreatina (1 g/L). A enumeração de LPC-37 foi realizada por semeadura em profundidade (*pour plate*), seguida de etapa de incubação a 37°C por 72 h, em atmosfera anaeróbica. As populações médias de LPC-37 foram apresentadas em log Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL) e submetidas à análise de variância (ANOVA). Ao final das 6 h de ensaio, foi observada redução de 4,69 log e 4,34 log, na população de LPC-37, quando incorporado em solução de NaCl e em leite de cabra, respectivamente. Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$) entre a sobrevivência do probiótico em solução de NaCl e em leite de cabra, embora a redução da população de LPC-37 tenha sido maior na solução de NaCl. Pode-se concluir que a matriz do leite de cabra não conferiu uma proteção adicional à cepa de LPC-37, nas condições experimentais avaliadas.

Palavras-chave: Condições gastrintestinais, *Lactobacillus paracasei* LPC37, leite de cabra, matriz alimentícia, probióticos.

Effect of goat milk matrix in the survival of *Lactobacillus paracasei* LPC37 against *in vitro* simulated gastrointestinal conditions

Abstract: The objective of this work was to evaluate whether the goat milk matrix confers any protection to the commercial probiotic strain of *Lactobacillus paracasei* LPC 37 (LPC-37) against *in vitro* simulated gastrointestinal (GI) conditions. Fresh cultures of LPC-37 cultivated in whole goat milk and MRS broth were evaluated. LPC-37 cultivated overnight in MRS was centrifuged and the pellet was resuspended in sodium chloride (NaCl) solution 0.85% (m/v). GI conditions were simulated by pH adjustment that ranged from 2.10 to 6.92. Samples were incubated at 37°C during 6 h under agitation. Acid chloride (HCl) solution 1 N, pepsin (3 g/L), and lipase (0,9 mg/L) were used to simulate the gastric phase and, for the simulation of enteric phases I and II, sodium phosphate solution (pH ~12) added of bile (10 g/L), and pancreatin (1 g/L) were used instead. LPC-37 enumeration was performed by use of the pour plate method, followed by incubation at 37°C during 72 h in anaerobic atmosphere. Average population of LPC-37 were shown as log Colony Forming Units per milliliter (CFU/mL) and submitted to analysis of variance (ANOVA). In the end of 6th hour of the trial, it was observed a reduction of 4.69 log and 4.34 log in LPC-37 population, assessed when the microorganism was incorporated in NaCl and goat milk, respectively. No significant difference ($P>0,05$) was observed in the survival of the probiotic strain in NaCl or goat milk, although the reduction of LPC-37 population had been more pronounced in NaCl solution. In conclusion, goat matrix did not exhibit any additional protection for LPC-37 strain in





the experimental conditions evaluated.

Keywords: Gastrointestinal conditions, *Lactobacillus paracasei* LPC37, goat milk, food matrix, probiotics.

Introdução

Para serem considerados probióticos e serem adicionados a determinados alimentos, microrganismos benéficos devem atender a diferentes requisitos, entre eles, apresentar capacidade de sobreviver durante a passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) e se multiplicar no ecossistema intestinal. Isso significa que tais micro-organismos devem resistir ao baixo pH do suco gástrico e à presença da pancreatina e da bile (CRUZ et al, 2011). Numerosos estudos avaliaram a sobrevivência de micro-organismos probióticos frente às condições do TGI e relataram taxas de sobrevivência da ordem de 10 a 30%. Tal variação pode estar associada a diversos fatores, sendo que o de maior destaque está relacionado à própria constituição da matriz alimentícia (CURTO et al., 2011). O leite de cabra e seus derivados são alimentos ricos em macronutrientes como proteínas, carboidratos, gorduras e minerais (RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2008). Dependendo da concentração, esses macronutrientes podem conferir proteção aos micro-organismos probióticos, no sentido de garantir a sua sobrevivência durante a passagem pelas diferentes condições adversas encontradas no TGI. O presente estudo teve como objetivo avaliar se a matriz do leite de cabra confere alguma proteção à cepa probiótica comercial de *Lactobacillus paracasei* LPC37 frente às condições gástricas e entéricas (de pH e enzimática) simuladas *in vitro*.

Material e Métodos

Foi empregado um modelo de simulação *in vitro* das condições do trato gastrointestinal (TGI), de acordo com Buriti et al. (2010), com alterações. Foram preparadas culturas frescas de *Lactobacillus paracasei* LPC37 (Danisco®, EUA) em leite de cabra integral (CAPPRY'S, Viamão, RS, Brasil) e caldo MRS. Após a incubação, a cultura em caldo MRS foi centrifugada e o *pellet* resultante foi ressuscitado em solução de NaCl 0,85% (m/v) de acordo com o volume inicial utilizado. Os inóculos em leite e em solução de NaCl foram incubados a 37°C durante 6 h, em banho de água sob agitação de 150rpm. Para a simulação da fase gástrica, foi utilizada solução de HCl 1N e as enzimas pepsina (3 g/L) e lipase (0,9 mg/L), com pH ajustado entre 2,29-2,35. Para a simulação da primeira fase entérica (I) foi adicionada solução tampão de fosfato de sódio (pH ~ 12), contendo bile (10 g/L) e pancreatina (1 g/L) e o pH foi ajustado entre 4,66-4,84. Nas 2 horas finais do ensaio (fase entérica II), o pH foi ajustado entre 6,25-6,49, através da adição de nova alíquota de tampão com pH 12, contendo bile (10 g/L) e pancreatina (1 g/L). Para a enumeração de *L. paracasei* foi empregada a técnica de semeadura em profundidade (*pour plate*), através da qual alíquotas de 1 mL das diluições decimais obtidas foram homogeneizadas com ágar MRS acidificado (pH 5,4, com auxílio de ácido acético glacial), seguida de etapa de incubação a 37°C, por 72 horas, em atmosfera de anaerobiose. Os resultados das contagens das populações microbianas obtidas foram apresentados em log de Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (log UFC/mL) e analisados através de teste estatístico (ANOVA).

Resultados e Discussão

As populações de *L. paracasei* LPC37 (LPC-37) em solução de NaCl 0,85% e em leite de cabra determinadas após cada fase do desafio *in vitro* simulando-se as condições encontradas no TGI estão reunidas na **Figura 1**.

Durante o teste foi observado que na fase gástrica houve uma redução na população de LPC-37 em solução NaCl de 4,38 log e para a cultura em leite de cabra esta diminuição foi de 4,00 log. Após a fase entérica I as populações de LPC-37 continuaram decrescendo, só que em menor extensão, não ultrapassando um ciclo log. Após a fase entérica II as populações de LPC-37 apresentaram uma pequena elevação, de 0,33 log na solução de NaCl e de 0,54 log em leite de cabra. Embora os resultados indiquem uma tendência de maior resistência da LPC-37 na matriz do leite de cabra, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$) entre as populações do probiótico na solução salina e em leite de cabra, demonstrando que a matriz do leite de cabra não conferiu proteção a níveis significativos para a cepa probiótica de LPC37.

Madureira et al. (2010) estudaram o efeito protetor da matriz alimentícia de queijo tipo requeijão português sobre a sobrevivência de cepas de *Lactobacillus acidophilus* LAFTI®L10, *Lactobacilos casei* LAFTI®L26 e *Bifidobacterium animalis* Bo. Aqueles autores utilizaram como controle as culturas de BAL cultivadas em caldo MRS e observaram que a matriz do queijo teve efeito significativo na proteção dos micro-organismos probióticos durante a simulação das





condições do TGI para todas as cepas. No caso dos queijos, a maior concentração de macronutrientes e a matriz sólida podem ser responsáveis pelo efeito protetor observado.

Curto et al. (2011) avaliaram a sobrevivência de *L. acidophilus* subsp *johnsonii*, *L. casei* subsp *shirota* e *L. casei* subsp *immunitas* isolados de diferentes produtos lácteos comerciais frente às condições gastrintestinais e observaram que a sobrevivência dos microrganismos diferiu estatisticamente nas fases gástrica e entérica avaliadas, dependendo da espécie e do tipo de matriz alimentícia estudada. Os pesquisadores também observaram que, ao comparar a fase inicial com a fase duodenal (fase entérica), houve uma redução nas populações das cepas probióticas que variou de 4 a 7 log dependendo da espécie de *Lactobacillus* estudada.

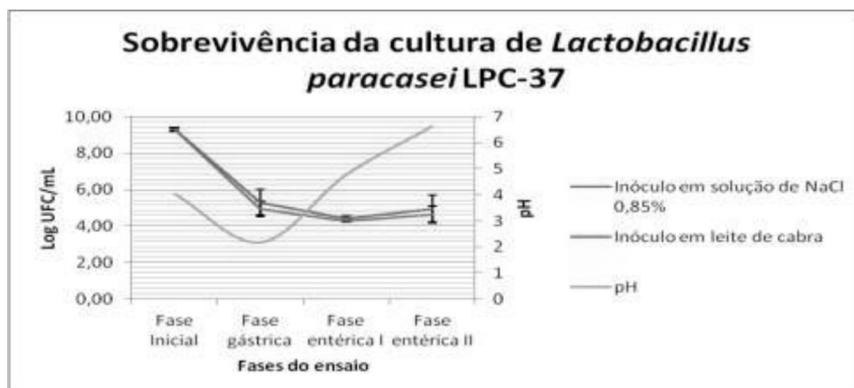


Figura 1. Populações médias (log UFC/ml) de *Lactobacillus paracasei* LPC37 inoculado em leite de cabra e solução de NaCl 0,85% determinadas em diferentes fases dos ensaios *in vitro* realizados, simulando-se a passagem pelo trato gastrintestinal.

Conclusões

De acordo com os resultados do presente estudo, o leite de cabra não conferiu efeito protetor significativo sobre *L. paracasei* LPC37, quando o micro-organismo foi avaliado em sistema *in vitro*, simulando-se à passagem pelo TGI. Estudos adicionais são necessários para avaliar se parâmetros como a concentração de gordura do leite poderia exercer influência sobre o potencial do microrganismo sobreviver às diferentes condições de estresse avaliadas.

Agradecimentos

DANISCO® do Brasil pela doação da cultura de *Lactobacillus paracasei* LPC37

Literaturas citadas

- BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in symbiotic guava mousse and its survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 121-129, 2010.
- CRUZ, A. G. DA; BURITI, F. C. A.; SOUZA, C. H. B. DE; FARIA, J. DE A. F.; SAAD, S. M. I. **Queijos probióticos e prebióticos**. In: Probióticos e prebióticos em alimentos. Fundamentos e aplicações tecnológicas. 1ª ed. SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G. DE; FARIA, J. DE A. F. São Paulo: Livraria Varela, 2011. p. 305-338
- CURTO, A. L.; PITINO, I.; MANDALARI, G.; DAINY, J. R.; FAULKS, R. M.; WICKHAM, M. S. J. Survival of probiotic lactobacilli in the upper gastrointestinal tract using an *in vitro* gastric model of digestion. **Food Microbiology**, doi: 10.1016/j.fm.2011.06.007, 2011.
- MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. N.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v.44, p.465-470, 2011.
- RAYNAL-LJUTOVAC, K.; LAGRIFFOUL, G.; PACCARD, P.; GUILLET, I.; CHILLIARD, Y. Composition of goat and sheep milk products: An update. **Small Ruminant Research**. v.79, p. 57-72, 2008.

