

Caracterização *in vitro* de propriedades probióticas de bactérias ácido lácticas

RESUMO

Nadja Fernandes da Silva

nadia_fernandes01@live.com
orcid.org/0000-0002-3664-6132
Universidade Federal de Pernambuco,
Recife, Pernambuco, Brasil

Katharine Angélica Aguiar Wanderley

katharineangelica1@gmail.com
orcid.org/0000-0002-5353-1572
Centro Universitário Brasileiro, Recife,
Pernambuco, Brasil

Arali da Costa Gomes

arali_gomes@hotmail.com
orcid.org/0000-0002-3182-2205
Centro Técnico Macêdo de Amorim,
Vitória de Santo Antão, Pernambuco,
Brasil

Christine Lamenha Luna Finkler

chrisluna@yahoo.com.br
orcid.org/0000-0002-3406-5668
Universidade Federal de Pernambuco,
Vitória de Santo Antão, Pernambuco,
Brasil

Os probióticos são microrganismos vivos que acarretam benefícios à saúde quando administrados em quantidades apropriadas. Para apresentarem alegações de propriedades funcionais ou de saúde, estes produtos precisam cumprir requisitos mínimos de eficácia e segurança definidos por órgãos regulatórios. Este trabalho teve como objetivo analisar o potencial probiótico de três cepas bacterianas empregadas em alimentos probióticos (*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, *Lb. paracasei* e *Lactococcus lactis*). Os métodos utilizados foram a avaliação *in vitro* da estabilidade das cepas frente às condições do trato gastrointestinal, análise *in vitro* da capacidade de adesão e colonização das cepas à mucosa intestinal e verificação de atividade antimicrobiana. As cepas apresentaram alta instabilidade frente ao pH 2,0 e à ação da pepsina, com perda de 100% da viabilidade celular nas primeiras duas horas do ensaio. As melhores características relacionadas à adesão e colonização da mucosa intestinal foram expressas por *Lb. rhamnosus* ATCC 7469, seguida por *Lb. paracasei*. *L. lactis* foi a cepa que menos demonstrou a característica de hidrofobicidade. Quanto à capacidade de produção de compostos antimicrobianos, observou-se que nenhuma cepa empregada neste estudo foi capaz de inibir o crescimento dos patógenos utilizados como indicadores. Deve-se levar em consideração que testes *in vitro*, apesar de serem ferramentas importantes no entendimento dos mecanismos e características intrínsecas das cepas, nem sempre expressam as condições *in vivo*, uma vez que diversos fatores relacionados ao hospedeiro e ao alimento utilizado como veículo interferem no mecanismo de resposta e atuação das bactérias probióticas.

PALAVRAS-CHAVE: Alimentos funcionais. Produtos probióticos. Viabilidade.

INTRODUÇÃO

A influência de hábitos alimentares saudáveis na manutenção da saúde e prevenção de doenças é um assunto com importante destaque nos dias atuais (ANNUNZIATA e VECCHIO, 2011; BALOGH et al., 2020). A percepção dos consumidores sobre os efeitos prejudiciais de uma alimentação desequilibrada despertou uma crescente busca por alimentos funcionais, que, além de fornecerem os nutrientes básicos, apresentam benefícios específicos à saúde devido aos seus componentes fisiologicamente ativos (SILVEIRA et al., 2009; GRANATO et al., 2020).

Dentre a variedade de ingredientes e produtos alimentícios que possuem alegações de propriedade funcional ou de saúde comprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), destacam-se os probióticos (OLIVEIRA et al., 2002; BRASIL, 2016), que são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades apropriadas, produzem efeitos benéficos à saúde do indivíduo (FAO/WHO, 2002).

Os benefícios à saúde propostos pelos probióticos são baseados no conhecimento de que a microbiota intestinal saudável pode proteger os indivíduos contra infecções, inibindo a adesão de patógenos locais e de origem alimentar ao trato gastrointestinal (SAAD et al., 2011; ROOBAB et al., 2020).

Para um microrganismo ser considerado probiótico, este deve atender a alguns requisitos mínimos estabelecidos pela ANVISA, tais como: apresentar resistência às condições de estresse presentes no trato gastrointestinal humano; ser constituinte da microbiota residente do aparelho digestivo humano; não possuir genes que levem a resistência a antibióticos; ser capaz de aderir e colonizar a mucosa intestinal; ser metabolicamente ativo no intestino e apresentar atividade antimicrobiana (NOGUEIRA e GONÇALVES, 2011; RAMÍREZ et al., 2011; RANADHEERA et al., 2012; GRANATO et al., 2020).

O leite fermentado é o alimento mais empregado como veículo de microrganismos probióticos, sendo o mais popular e o mais consumido em todo o mundo (FONDÉN et al., 2003; PIMENTEL et al., 2018). Existem numerosos tipos de leites fermentados fabricados em diferentes partes do mundo. O *Filmjölk* é um tipo

de leite fermentado escandinavo, consumido amplamente na Suécia, cujas cepas são formadas predominantemente por *Lactococcus lactis* ssp. (OHLSSON et al., 2017). A característica básica de cada tipo de leite fermentado resulta tanto do tipo de microrganismo utilizado, quanto das condições do seu processo de produção (BATT e TORTORELLO, 2014).

A avaliação prévia das características de cepas empregadas em tais produtos representa uma ferramenta indispensável no processo de reconhecimento e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em alimentos. Neste contexto, o objetivo da presente pesquisa foi analisar e comparar o potencial probiótico de três cepas (*Lb. rhamnosus* ATCC 7469, *Lb. Paracasei* e *Lactococcus lactis*) empregadas em alimentos probióticos, tais como leite fermentado.

MATERIAL E MÉTODOS

OBTENÇÃO DAS CEPAS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Bioprocessos do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco UFPE/CAV. A cepa *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 foi adquirida da American Type Culture Collection (ATCC, USA) e foi mantida sob a forma liofilizada; *Lb. paracasei* foi isolado de um leite fermentado comercial disponível em supermercados do município de Vitória de Santo Antão-PE e a cepa *Lactococcus lactis* foi obtida a partir de amostras desidratadas da cultura *Filmjölk*, um leite fermentado tradicional da Suécia, fornecida por voluntários do site kefir.com.br

REATIVAÇÃO, ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

As culturas desidratadas foram reativadas em leite em pó integral diluído e incubadas em BOD a 30 °C (*Lactococcus lactis*) e a 37 °C (*Lb. rhamnosus* ATCC 7469 e *Lb. Paracasei*) durante 48 h. Após a fermentação do leite, foi realizada a etapa de isolamento das culturas, empregando-se diluições decimais seriadas (10^{-1}) das amostras e posterior inoculação de alíquotas de 100 µL em placas de Petri com meio de cultura MRS Ágar (acrescidos de 2 % p/v de glicose), utilizando as técnicas

de semeadura *pour plate* e de superfície. As amostras foram incubadas novamente em BOD sob as mesmas condições descritas anteriormente.

As colônias identificadas visualmente passaram por uma análise microscópica e em seguida foram repicadas isoladamente em placas de Petri com o mesmo meio de cultura, utilizando a técnica de semeadura *pour plate*. As colônias foram incubadas a 37 °C durante 48 h, e as cepas individuais foram confirmadas através de análise microscópica.

Para manutenção das culturas, foram realizados repiques periódicos dos isolados selecionados para este estudo utilizando o meio de cultura caldo MRS (acrescidos de 2 % p/v de glicose), de acordo com o mesmo processo de incubação descrito na etapa de isolamento.

Com o objetivo de conservar as cepas por um maior intervalo de tempo, as culturas isoladas foram congeladas em glicerol a 40 % v/v e mantidas a -20 °C.

TESTE *IN VITRO* DE TOLERÂNCIA GASTROINTESTINAL

A sobrevivência das células das bactérias ácido lácticas foi avaliada em sucos gástrico e entérico simulados. Os experimentos foram realizados com base nos procedimentos de Liserre e colaboradores (2007), com adaptações no pH inicial e adição de pepsina, pancreatina e bile nas etapas de simulação das condições do trato gastrointestinal.

Inicialmente foi preparada uma solução de pepsina (3 g/L) em solução ácida (37,5 mL de HCl 1N, 1 g de NaCl em água destilada até completar 500 mL). O pH dessa solução foi ajustado para 2,0 usando uma solução de NaOH 1N. Um volume de 2 mL de células centrifugadas a 3000 rpm por 15 min foi lavado por duas vezes utilizando-se solução salina (NaCl 0,85 % p/v). 1 mL desta suspensão celular foi adicionado a um Erlenmeyer de 125 mL de capacidade com 30 mL da solução ácida contendo pepsina preparada anteriormente, sendo a mistura incubada a 37 °C em *shaker* por 120 min a 150 rpm.

Posteriormente, foram adicionados pancreatina (1 g/L) e bile (10 g/L) e o pH da amostra foi ajustado para 5,6. A mistura foi novamente incubada a 37 °C por 120 min a 150 rpm. Na última etapa, o pH foi elevado para 7,5 e foi realizada a

adição de pancreatina e bile para correção de suas concentrações para 1g/L e 10g/L respectivamente. A mistura foi novamente incubada nas mesmas condições.

A contagem de células viáveis foi realizada mediante a retirada de amostras no início e no final de cada etapa, e as diluições das amostras foram realizadas empregando-se água peptonada a 0,1 % (p/v). Todas as soluções empregadas no ensaio foram esterilizadas por meio de filtração em membrana de 0,22 µm.

TESTE DE HIDROFOBICIDADE

Este ensaio foi realizado em triplicata, de acordo com as técnicas descritas por Rosenberg et al. (1980), Pelletier et al. (1997) e Pérez et al. (1998), com modificações.

As cepas utilizadas no presente estudo foram cultivadas durante 48 h a 37 °C em Erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 100 mL de meio caldo MRS suplementado com 2 % (p/v) de glicose. Os cultivos foram centrifugados a 3000 rpm por 15 min em tubos tipo Falcon. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com 10 mL de solução tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ (50 mM, pH 7,0). Os materiais remanescentes de *Lb. rhamnosus* e *Lb. casei* foram ressuspensos em 32 mL de solução de NaNO_3 (0,1 M, pH 6,2), para manter uma concentração equivalente de células entre as cepas, o material remanescente de *L. lactis* foi ressuspenso em 8 mL da mesma solução.

Em seguida, 5 mL das suspensões bacterianas foram transferidos para tubos de vidro rosqueáveis e adicionou-se 1 mL dos seguintes solventes: xilol (solvente apolar), clorofórmio (solvente ácido) e acetato de etila (solvente básico). O material ficou em repouso por 5 min e logo depois as fases foram agitadas em vórtex por 2 minutos. Após a agitação, os tubos permaneceram em repouso durante 60 min, e após a separação total das fases, foi feita a leitura de absorbância da fase aquosa a 600 nm em espectrofotômetro (Spectrum®).

O percentual de adesão das cepas, de acordo com o solvente utilizado, foi determinado de acordo com a seguinte equação:

$$H (\%) = \frac{(\text{DOA} - \text{DOB}) \times 100}{\text{DOA}}$$

Onde:

H (%): grau de hidrofobicidade

DOA: densidade ótica A (Branco - 5 mL de solução de NaNO₃; amostra - 5 mL de solução de NaNO₃ + Células)

DOB: densidade ótica B (Branco - 4 mL de solução de NaNO₃ + 1 mL dos solventes em cada tubo; amostra - 5 mL de suspensão celular em solução de NaNO₃ + 1 mL dos solventes em cada tubo)

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Este ensaio foi realizado com base no método de disco-difusão descrito por Bauer et al. (1996), com adaptações. Os microrganismos patogênicos testados foram: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Streptococcus pyogenes* clínica, os quais foram obtidos a partir da coleção do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Centro Acadêmico de Vitória, da Universidade Federal de Pernambuco.

As cepas probióticas foram repicadas em meio caldo MRS e incubadas a 37 °C por 24 h. Após esse período, as bactérias foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi reservado e as células foram ressuspensas em solução salina estéril 0,85% (p/v).

Os patógenos foram repicados em tubo inclinado contendo ágar nutriente e incubados a 37 °C por 24 h. Para cada patógeno, foi preparada uma suspensão em solução salina estéril (NaCl 0,85 % p/v) com turvação compatível ao tubo 0,5 na escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Com auxílio de *swabs* estéreis, as suspensões dos patógenos foram semeadas em placas de Petri contendo o meio de cultura Mueller-Hinton e deixadas em repouso por aproximadamente 10 minutos para a completa absorção dos inóculos.

Utilizando-se uma pinça, discos de papel mata-borrão (6 mm de diâmetro) foram embebidos nas amostras das células e do sobrenadante das bactérias probióticas e aplicados diretamente nas placas contendo o meio com os patógenos. Para o controle negativo e positivo, foi adicionado em cada placa um disco estéril e um disco de cloranfenicol 30 µcg, respectivamente.

Após 24 h de incubação a 37 °C, a possível presença de atividade antimicrobiana foi detectada através da formação de halos em torno dos discos,

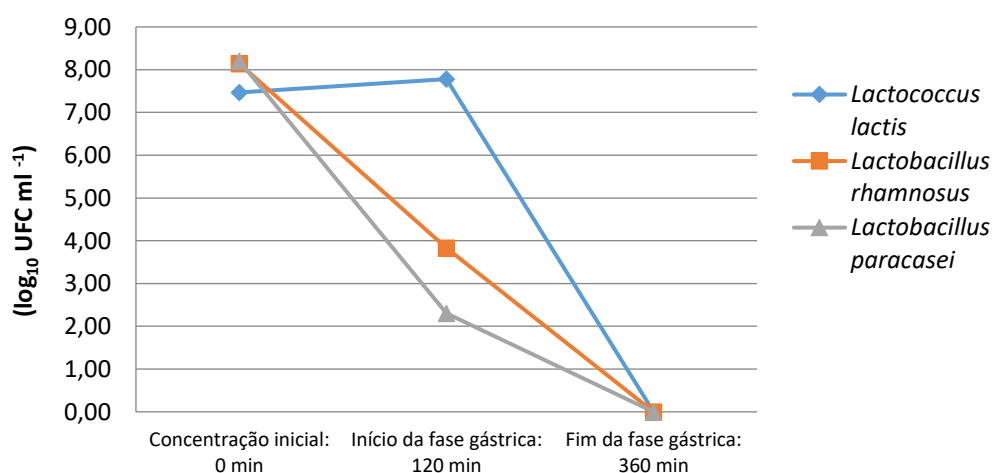
os quais foram medidos com paquímetro e expressos em milímetros. Os resultados foram expressos em presença ou ausência de atividade, conforme o tamanho dos halos de inibição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dos critérios básicos adotados para selecionar uma bactéria com potencial probiótico é a avaliação da sua capacidade de resistência às condições de estresse presentes no trato gastrointestinal humano (KLU e CHEN, 2015; SHEHATA et al., 2016; GARCIA et al., 2016).

Como pode ser observado na Figura 1, as cepas não se mostraram resistentes ao pH 2,0 e à ação da pepsina, uma vez que só se mantiveram viáveis no início da simulação da fase gástrica. Houve uma perda de 100 % da viabilidade celular nas primeiras duas horas do ensaio.

Figura 1 - Capacidade de resistência das cepas ao trato gastrointestinal



Fonte: Elaborado pelos autores (2016).

Resultados similares aos encontrados neste trabalho foram relatados em outras pesquisas. Zárate et al. (2000) mostraram que a viabilidade de bactérias lácticas foi seriamente afetada quando submetidas a pH 2,0, com redução acentuada na contagem de células viáveis nos primeiros 30 minutos de exposição. Da mesma forma, Garcia et al. (2016), ao avaliarem a resistência de cinco espécies de *Lactobacillus* isoladas de subprodutos de processamento de polpa de frutas,

também se depararam com redução acentuada nas contagens das diferentes cepas após exposição ao pH 2,0, onde a grande maioria perdeu a viabilidade total antes de 45 min de exposição.

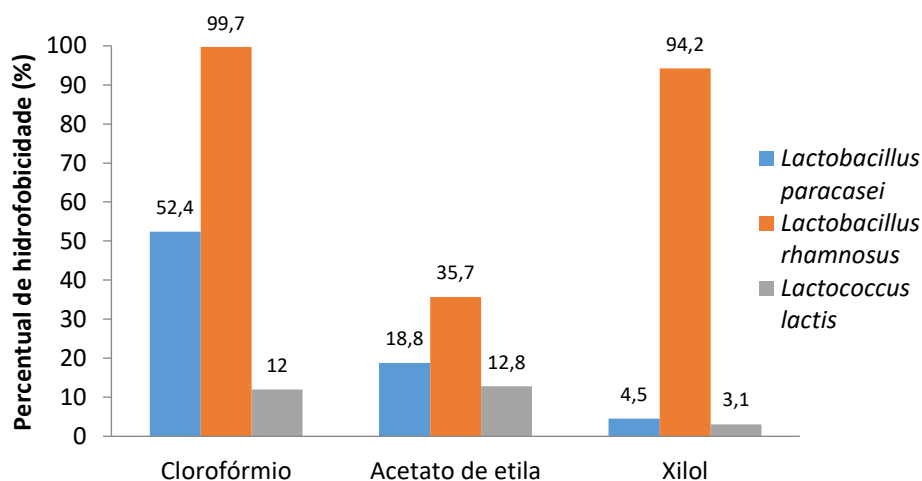
Embora algumas cepas isoladas expressem resistência às condições de estresse presentes no trato gastrointestinal, como pôde ser observado por Handa e Sharma (2016), está comprovado que a associação dos microrganismos probióticos com alimentos melhora a viabilidade celular durante a passagem pelo trato gastrointestinal humano (MONTEAGUDO-MERA et al., 2012). Os alimentos que possuem um alto teor de gordura e de proteínas são capazes de proteger as bactérias do ácido do estômago, acarretando uma melhor sobrevivência ao trânsito intestinal (ZÁRATE et al., 2000; KLU e CHEN, 2015).

Neste contexto, Klu e Chen (2015) observaram estabilidade de três espécies de bactérias probióticas, mesmo em pH 1,6. Os autores estudaram o efeito de matrizes de manteiga de amendoim sobre a viabilidade dos probióticos e concluíram que estes produtos são viáveis para a incorporação de microrganismos probióticos, pois promovem uma proteção contra o estresse presente no trato gastrointestinal humano.

A capacidade de resistência dos probióticos também sofre influência dos ingredientes utilizados no alimento veículo, como por exemplo, as substâncias prebióticas, como inulina, fruto-oligossacarídeos, galacto-oligossacarídeos e lactulose (RANADHEERA et al., 2012). Em vista disso, não se pode afirmar precisamente que os microrganismos empregados neste estudo não possuem propriedade probiótica, pois a tolerância dos probióticos ao trato gastrointestinal depende tanto de sua resistência intrínseca, quanto do tipo de alimento utilizado como veículo (MONTEAGUDO-MERA et al., 2012). Outro fator a ser considerado é que a maioria os trabalhos que relataram sobrevivência de cepas probióticas ao trato gastrointestinal, como o de Garcia et al. (2016) e o de Handa e Sharma (2016), utilizaram metodologias com ensaios isolados e não associaram os valores de pH e as enzimas envolvidas em cada fase da digestão, diferentemente do presente estudo.

Quanto à característica de hidrofobicidade, propriedade avaliada *in vitro* que representa a capacidade de adesão e colonização dos microrganismos às células da mucosa intestinal, a Figura 2 mostra o comportamento de cada cepa frente aos diferentes tipos de solventes utilizados.

Figura 2 - Percentual de Hidrofobicidade da parede celular das cepas



Fonte: Elaborado pelos autores (2016).

A ocorrência de interações hidrofóbicas entre as membranas celulares da cepa e do hospedeiro é uma característica importante, pois é através do mecanismo de competição por sítios de adesão na superfície do epitélio intestinal que as bactérias probióticas exercem suas funções (PÉREZ et al., 1998; BARBOSA et al., 2005). A cepa que expressou melhor perfil de hidrofobicidade foi *Lb. rhamnosus*, que apresentou um elevado grau de migração para a fase apolar (94,2 %), o que caracteriza uma superfície celular mais ácida (99,7 %) e menos básica (35,7 %).

Já a cepa *Lb paracasei* apresentou uma baixa porcentagem de migração de células para a fase apolar (4,5 %), porém expressou uma superfície celular mais ácida (52,4%) e menos básica (18,8%).

O microrganismo que menos demonstrou a característica de hidrofobicidade foi *L. lactis*, pois exibiu a menor porcentagem de migração de células para a fase polar (3,1 %) e uma superfície celular com cargas ácidas e básicas proporcionais (12,0 e 12,8 %, respectivamente).

Assim como neste estudo, variações do nível de hidrofobicidade entre cepas de lactobacilos foram relatadas por Vinderola e Reinheimer (2003), onde foram encontrados percentuais entre 10,9 % e 67,8 %, indicando que esta característica pode ser amplamente divergente dentro da mesma espécie. Por outro lado, García-Cayuela et al. (2014) encontraram altos valores de hidrofobicidade (60%) para todas as cepas de lactobacilos analisadas em seu estudo, o que corroborou com seu argumento de que estes microrganismos normalmente possuem superfícies celulares de natureza mais hidrofóbica.

Alterações no grau de hidrofobicidade das cepas são comuns e diversos fatores interferem nesta propriedade, tais como condições de cultivo, nível de crescimento, pH, temperatura, osmolaridade, matriz alimentar, entre outros (VINDEROLA e REINHEIMER, 2003; WANG e HAN, 2007).

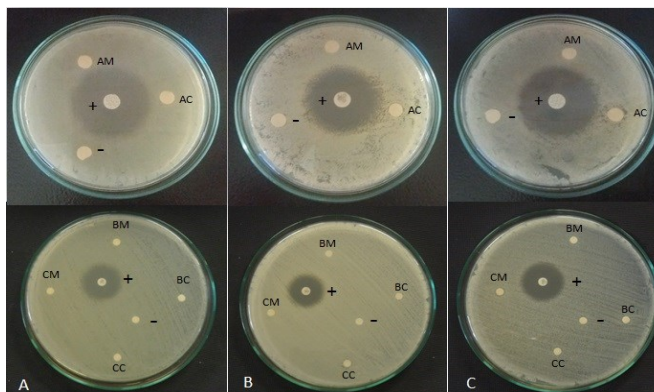
Outra característica analisada no presente estudo foi a capacidade de inibição de patógenos, uma condição importante na manutenção de uma microbiota intestinal saudável, que depende de mecanismos que envolvem a produção e liberação de compostos antimicrobianos (ácidos graxos de cadeia curta e outros ácidos orgânicos, como o ácido lático e o ácido acético), bacteriocinas e espécies reativas de oxigênio, como por exemplo, peróxido de hidrogênio (MAKRAS e VUYST, 2006; ARGYRI et al., 2013).

Foi analisada a capacidade inibitória tanto das células livres, quanto dos metabólitos de *Lb. rhamnosus*, *Lb. paracasei* e *L. lactis* contra três patógenos utilizados como indicadores. Apesar das bactérias ácido lácticas serem conhecidas como produtoras de compostos antimicrobianos (BALCÁZAR et al., 2008), nenhuma cepa empregada neste estudo mostrou-se capaz de inibir o crescimento dos patógenos utilizados como indicadores (Figura 3).

Resultados similares foram observados no estudo de Argyri et al. (2013), onde foi analisado o potencial probiótico de 71 cepas de bactérias lácticas (17 *Leuconostoc mesenteroides*, 1 *Ln. pseudomesenteroides*, 13 *Lactobacillus plantarum*, 37 *Lb. pentosus*, 1 *Lb. paraplantarum*, e 2 *Lb. paracasei subsp. Paracasei*) e não foi constatada inibição do crescimento dos

patógenos *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* e *Escherichia coli* O157:H7 por nenhuma cepa testada.

Figura 3. Resultado do ensaio antimicrobiano



Legenda: A: *Escherichia coli*; B: *Staphylococcus aureus*; C: *Streptococcus pyogenes*; + controle positivo; - controle negativo; AC: célula do *L. lactis*; AM: metabólito do *L. lactis*; BC: célula de *Lb. rhamnosus*; BM: metabólito de *Lb. rhamnosus*; CC: célula de *Lb. paracasei*; CM: metabólito de *Lb. paracasei*.

Fonte: Elaborado pelos autores (2016).

Balcázar et al. (2008) também mostraram que, de três cepas de bactérias lácticas avaliadas (*L. lactis* CLFP 101, *L. plantarum* CLFP 238 e *L. fermentum* CLFP 242), apenas *L. lactis* CLFP 101 reduziu a adesão de todos os patógenos empregados em seu estudo.

Por outro lado, diversos estudos apontam a atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas, como pôde ser observado por Andrade e colaboradores (2014), que avaliaram a atividade antagonista de *Lactobacillus* spp. contra diversos patógenos, e por Garcia et al. (2016), que examinaram a efetividade de cinco cepas de *Lactobacillus* em inibir bactérias patogênicas. Em ambos os estudos, todas as cepas foram capazes de inibir o crescimento dos patógenos, dentre as quais estão *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* e *S. typhimurium*.

Além dos fatores mencionados anteriormente, a atividade antimicrobiana pode sofrer influência de metabólitos formados durante o processo de fermentação e de redução direta do pH (DIAS, SILVA, TIMM, 2018). Campaniello et al. (2015) sugerem que a atividade antimicrobiana poderia ser atribuída a baixos valores de pH do meio, uma vez que a inibição de microrganismo patogênicos por propionibactérias em seu estudo só foi possível em culturas celulares e sobrenadantes que apresentaram pH ácido.

Pereira e Gómez (2007) mostraram que a atividade antagonista de bactérias probióticas é dependente das condições de cultivo, como concentração de oxigênio no meio, temperatura empregada e período de incubação. Esses fatores interferem no pH e na quantidade de ácido láctico produzida, elementos sugeridos por eles como responsáveis pela atividade antagonista.

CONCLUSÃO

A análise da capacidade de resistência das cepas ao trato gastrointestinal mostrou baixa tolerância às condições de estresse presentes no trato gastrointestinal humano.

Em relação à propriedade de adesão e colonização da mucosa intestinal, as melhores características foram expressas por *Lb. rhamnosus*, seguida por *Lb. paracasei*. *L. lactis* foi o que menos demonstrou a característica de hidrofobicidade.

Quanto à capacidade de produção de compostos antimicrobianos, observou-se que nenhuma cepa empregada neste estudo foi capaz de inibir o crescimento dos patógenos utilizados como indicadores.

Deve-se levar em consideração que testes *in vitro*, apesar de serem ferramentas importantes no entendimento dos mecanismos e características intrínsecas das cepas, nem sempre expressam as condições *in vivo*, uma vez que diversos fatores do hospedeiro interferem no mecanismo de resposta e atuação das bactérias. Além disso, o alimento veículo dos microrganismos probióticos também é um fator que deve ser considerado.

***In vitro* characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria**

ABSTRACT

Probiotics are living microorganisms that bring health benefits when administered in appropriate amounts. To submit claims of functional or health properties, they need to meet minimum safety and efficacy requirements set by regulatory bodies. This study aimed to analyze the probiotic potential of three bacterial strains used in probiotic foods (*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, *Lb. paracasei* and *Lactococcus lactis*). The methods used were in vitro evaluation of strains stability against gastrointestinal tract conditions, in vitro analysis of the adhesion and colonization capacity of the strains to the intestinal mucosa and verification of antimicrobial activity. The strains showed high instability to pH 2.0 and pepsin action, with 100% loss of cell viability in the first two hours of the trial. The best characteristics related to adhesion and colonization of the intestinal mucosa were expressed by *Lb. Rhamnosus* ATCC 7469, followed by *Lb. paracasei*. *Lactococcus lactis* was the least demonstrated the characteristic of hydrophobicity. Regarding production capacity of antimicrobial compounds, it was observed that no strain used in this study was able to inhibit the growth of pathogens used as indicators. It is important to consider that in vitro tests, although they are important tools in understanding the mechanisms and intrinsic characteristics of the strains, do not always express the conditions in vivo, since several factors related to the host and food used as a vehicle interfere in the mechanism of response and action of probiotic bacteria.

KEYWORDS: Functional foods. Probiotic products. Viability

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, C. R. G. et al. Propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus spp.* isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra - MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 5, p.1592-1600, 2014. <https://doi.org/10.1590/1678-6781>
- ANNUNZIATA, A.; VECCHIO, R. Functional foods development in the European market: A consumer perspective. **Journal Of Functional Foods**, v. 3, n. 3, p.223-228, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.03.011>
- ARGYRI, A. A. et al. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. **Food Microbiology**, v. 33, n. 2, p.282-291, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.005>
- BALOGH, Tímea; KŐSZEGI, Irén; HOYK, Edit. The market of functional foods. **Gradus**, v. 7, n. 2, p. 161-166, 2020. <https://doi.org/10.47833/2020.2.AGR.031>
- BALCÁZAR, J. L. et al. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. **Aquaculture**, v. 278, n. 1-4, p.188-191, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.014>
- BARBOSA, F. H. F. et al. Perfil de hidrofobicidade da superfície celular de *Bifidobacterium lactis* Bb12 e *Bifidobacterium longum* Bb46 em função do meio de cultura. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 2, p.1-11, 2005.
- BATT, C.; TORTORELLO, M. L. **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2 ed. Academic Press, p. 1014, 2014.
- BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966. <https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4 ts.493>
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em 14 de março de 2016. https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/alegacoes-de-propriedade-funcional-aprovadas_anvisa.pdf.
- CAMPANIELLO, D. et al. Screening of *Propionibacterium spp.* for potential probiotic properties. **Anaerobe**, v. 34, p.169-173, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.06.003>
- DIAS, P. A.; SILVA, D. T.; TIMM, C. D. Atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de grãos de kefir. **Ciênc. anim. bras.**, v. 19, e-40548, 2018. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v19e-40548>
- FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization. **Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting**

Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, 2002.

FONDÉN, R. et al. Lactic acid bacteria (LAB) in functional dairy products. 1 ed. In: MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. **Functional Dairy Products.** Cambridge: Elsevier Science & Technology, Cap. 10. p. 255-262, 2003.
<https://doi.org/10.1533/9781855736917.2.244>

GARCÍA-CAYUELA, T. et al. Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. **Food Research International**, v. 57, p.44-50, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.010>

GARCIA, E. F. et al. Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. **Frontiers In Microbiology**, v. 7, p.531-541, 2016.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01371>

GRANATO, Daniel et al. Functional foods: Product development, technological trends, efficacy testing, and safety. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 11, p. 93-118, 2020. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>

HANDA, S.; SHARMA, N. In vitro study of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* F22 isolated from chhang – A traditional fermented beverage of Himachal Pradesh, India. **Journal Of Genetic Engineering And Biotechnology**, v. 14, n. 1, p.91-97, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.08.001>

KLU, Y. A. K.; CHEN, J. Effect of peanut butter matrices on the fate of probiotics during simulated gastrointestinal passage. **Lwt - Food Science And Technology**, v. 62, n. 2, p.983-988, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.018>

LISERRE, A. M.; RÉ, M. I.; FRANCO, B. D. G. M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, v. 21, n. 1, p.1-16, 2007.
<https://doi.org/10.1080/08905430701191064>

MAKRAS, L.; VUYST, L. The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p.1049-1057, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.09.006>

MONTEAGUDO-MERA, A. et al. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. **Journal Of Functional Foods**, v. 4, n. 2, p.531-541, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.02.014>

NOGUEIRA, J. C. R.; GONÇALVES, M. C. R. Probióticos - Revisão da Literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 4, p.487-492, 2011.
<https://doi.org/10.4034/RBCS.2011.15.04.16>

OHLSSON, Jonas A. et al. Lactose, glucose and galactose content in milk, fermented milk and lactose-free milk products. **International Dairy Journal**, v. 73, p. 151-154, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.06.004>

OLIVEIRA, M. N. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.1, p.1-21, 2002. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322002000100002>

PELLETIER, C. et al. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei subsp. casei*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p.1725-1731, 1997. <https://doi.org/10.1128/aem.63.5.1725-1731.1997>

PEREIRA, V. G.; GÓMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 2, p.229-239, 2007. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2007v28n2p229>

PÉREZ, P. F. et al. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, n. 1, p.21-26, 1998. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.1.21-26.1998>

PIMENTEL, G. et al. Metabolic footprinting of fermented milk consumption in serum of healthy men. **The Journal Of Nutrition**, v. 148, n. 6, p. 851-860, 2018. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy053>

RAMÍREZ, J. C. R. et al. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. **Revista Fuente**, v. 2, n. 7, 2011.

RANADHEERA, C. S. et al. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, v. 49, n. 2, p.619-625, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.007>

ROOBAB, Ume et al. Sources, formulations, advanced delivery and health benefits of probiotics. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 17-28, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.01.003>

ROSENBERG, M.; GUTNICK, D.; ROSENBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. **Fems Microbiology Letters**, v. 9, n. 1, p.29-33, 1980. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1980.tb05599.x>

SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e Prebióticos em Alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1. ed. São Paulo: Varela, v. 3, p. 669, 2011.

SANTOS, T. T. et al. Characterization of lactobacilli strains derived from cocoa fermentation in the south of Bahia for the development of probiotic cultures. **Lwt - Food Science And Technology**, v. 73, p.259-266, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.003>

SHEHATA, M. G. et al. Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. **Annals Of Agricultural Sciences**, v. 61, n. 1, p.65-75, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.aoas.2016.03.001>

SILVEIRA, T. F. V.; VIANNA, C. M. M.; MOSEGUI, G. B. G. Brazilian legislation for functional foods and the interface with the legislation for other food and medicine classes: contradictions and omissions. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 19, n. 4, p.1189-1202, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0103-73312009000400015>

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, v. 36, n. 9-10, p.895-904, 2003.

[https://doi.org/10.1016/s0963-9969\(03\)00098-x](https://doi.org/10.1016/s0963-9969(03)00098-x)

WANG, Y.; HAN, J. The role of probiotic cell wall hydrophobicity in bioremediation of aquaculture. **Aquaculture**, v. 269, n. 1-4, p.349-354, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.010>

ZÁRATE, G. et al. Viability and beta-galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. **Journal of food Protection**, v. 63, n. 9, p.1214-1221, 2000.

<https://doi.org/10.4315/0362-028x-63.9.1214>

Recebido: 24 jul. 2020.

Aprovado: 03 fev. 2021.

Publicado: 08 set. 2021.

DOI: 10.3895/rbta.v15n1.12837

Como citar:

DA SILVA, Nadja Fernandes et al. Caracterização in vitro de propriedades probióticas de bactérias ácido lácticas **R. bras. Technol. Agroindustr.**, v. 15, n. 1, p. 3556-3572, jan./jun. 2021. Disponível em: <<https://periodicos.utfpr.edu.br/rbta>>. Acesso em: XXX.

Correspondência:

Christine Lamenha Luna Finkler

R. Alto do Reservatório, s/n, Vitória de Santo Antão - PE, 55608-680.

Direito autoral: Este artigo está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

