

## Viabilidade e sobrevivência da bactéria *Bifidobacterium* em fluido gástrico simulado

TOMASELLI, Liéslherita Poliana Cunico \*; PEDROSO, Peterson Zanotto \*\*; FOPPA, Talize \*\*\*  
OLIVEIRA, Leyza Paloschi de \*\*\*\*

### Resumo

A microbiota intestinal tem grande importância na saúde humana, protegendo o organismo de doenças ou causando-as. Os probióticos são vistos como um importante componente da indústria de alimentos funcionais que exercem função de proteção da saúde do hospedeiro. A quantidade de microrganismos probióticos sobrevivente é essencial para sua funcionalidade, isto dependerá da linhagem do microrganismo escolhido durante o processo de fabricação do produto. Dentro deste contexto, avaliou-se a sobrevivência da bactéria probiótica *Bifidobacterium* em meio gástrico simulado, utilizando-se de parâmetros químicos e microbiológicos em produto de leite fermentado que indicava a presença da bactéria. Por meio de contagem em placa da população microbiana, coloração de Gram, teste de catalase e aspectos morfológicos, foi possível verificar a viabilidade e sobrevivência da bactéria probiótica quando submetidas a pH3, durante zero (0), cinco (5) e quinze (15) minutos. Com os resultados obtidos, pode-se concluir que o produto estudado está de acordo com a legislação brasileira vigente, podendo então oferecer os benefícios propostos.

Palavras-chaves: Probióticos. *Bifidobacterium*. Fluido Gástrico Simulado.

### *Viability and survival of bifidobacterium in simulated gastric fluid*

### *Abstract*

*The intestinal microbial has important role in human health and provide protection against some diseases, although sometimes it also can cause some other diseases. The probiotics have been seen as an important component of functional food industry, which exert a protective function on their host's health. The amount of probiotic microorganisms surviving is essential for its functionality and it will depend on the strain of microorganism selected during the process of product's manufacturing. In this context, the survival of probiotic bacteria Bifidobacterium present in fermented milk products, that showed in its information the presence of this bacteria, was evaluated in simulated gastric fluid, using chemical and microbiological parameters. It was possible to verify in samples analyzed*

\* Graduada em Farmácia pela Universidade do Alto Vale do Rio do Peixe – Caçador SC – e-mail: lies.tomaselli@yahoo.com.br.

\*\* Graduado em Farmácia pela Universidade do Alto Vale do Rio do Peixe – Caçador SC – e-mail: petersonzanotto@hotmail.com.

\*\*\* Mestre em Farmácia pela Universidade Federal de Santa Catarina. Docente e coordenadora do curso de Farmácia da Universidade do Alto Vale do Rio do Peixe, Campus Caçador – e-mail: talize@uniarp.edu.br.

\*\*\*\* Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Santa Catarina e docente da Universidade do Alto Vale do Rio do Peixe, Campus Caçador – e-mail: leyza@uniarp.edu.br.

*the existence as well as the survival of this probiotic bacteria in simulated gastric fluid with pH3 for zero (0), five (5) and 15 minutes, through plate count of microbial population, Gram staining, catalase test and morphological aspects. According to results obtained, it is possible to conclude that the product analyzed is in agreement on with the current Brazilian legislation and so can offer the benefits proposed.*

*Keywords: Probiotics. Bifidobacterium. Simulated Gastric Fluid.*

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtos lácteos como leites fermentados, bebidas lácteas fermentadas ou não, queijos, *petit suisse* e sobremesas lácteas produzidos com bactérias probióticas representam o mais importante segmento de alimentos funcionais, que além de fornecerem nutrição básica, promovem a saúde.

Um documento que ampliava o conceito do que era probiótico foi elaborado na Europa no ano de 1999. Definia-se, portanto, que probiótico é “um alimento que incorpora microrganismos vivos (lactobacilos, bifidobactérias) e que, consumido em quantidades suficientes, deve produzir efeitos benéficos à saúde e ao bem-estar, para além dos efeitos nutricionais habituais” (SOUZA; SILVA, 2002).

O gênero *Bifidobacterium* já faz parte da microbiota normal humana, conseguindo resistir à atividade gástrica (PIMENTEL; FRANCKY; GOLLUCKE, 2005). São caracterizadas como bactérias Gram-positivas, que não formam esporos, desprovidos de flagelos, catalase-negativos e anaeróbios, podendo apresentar formas variadas que incluem bacilos curtos e curvados a bacilos bifurcados. A temperatura ótima de crescimento das bactérias bífidas abrange de 37°C a 41°C, não havendo crescimento em temperaturas abaixo de 25-28°C e acima de 43°-45°C. O pH ótimo de crescimento compreende a faixa de seis (6,0) a sete (7,0), não ocorrendo crescimento abaixo de quatro e meio (4,5) a cinco (5,0) ou acima de oito (8,0) a oito e meio (8,5) (HOLT *et al.*, 1994).

Diversas espécies incluem esse gênero, mas uma delas tem origem de leite fermentado e apresenta grande tolerância ao oxigênio. São microrganismos formadores de ácido lático e ácido acético como seus produtos finais principais do metabolismo de carboidratos (JAY, 2005). As cepas de *Bifidobacterium* podem se comportar de forma diversa em relação à sobrevivência em ambiente gástrico. Berrada e colaboradores (1991), ao submeter dois leites fermentados a condições *in vitro* de simulação do ambiente gástrico observaram que das duas cepas de *Bifidobacterium* testadas, apenas uma delas sobreviveu muito bem durante, pelo menos, 90 minutos e que a segunda cepa foi menos resistentes às condições submetidas.

A quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  Unidades Formadoras de Colônias - UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia (BRASIL, 2005). Isso corresponderia ao consumo diário de 200 a 400mL de leite fermentado ou iogurte contendo  $5,0 \times 10^6$  UFC/ml da(s) cepa(s) probióticas declaradas (BARRETO *et al.*, 2003). Para atingir contagens de  $10^6$  a  $10^8$  UFC/g no trato gastrointestinal, sugere-se a adição de  $10^9$  a  $10^{10}$  UFC/100g de produto (CHARTERIS *et al. apud* Lerayer, 2009, p. 169).

Barreto e colaboradores (2003) avaliaram a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias totais em 177 amostras de 15 marcas de produtos probióticos comercializados no Brasil, no período de janeiro a agosto de 2001. Os resultados obtidos mostraram que a maioria dos produtos comercializados no Brasil é produzida com fermentos lácticos tradicionais e apresentaram contagem total de viáveis acima de  $10^7$ /g. Os produtos que incorporam probióticos de maior interesse, como *Lactobacillus acidophilus* e bifidobactérias, e o declaram no rótulo, ao contrário, são mais raros e encontradas em contagens abaixo de  $10^5$ /g, na maioria das amostras analisadas.

Em relação à causa da perda de viabilidade dessas cepas, os autores citados acima não relacionaram com o tempo de estocagem, mas consideraram mais provável que decorra da sensibilidade às próprias condições de processo de fabricação. Sugerem inovações tecnológicas como a seleção de cepas mais resistentes, a pré-adaptação às condições de estresse, a adição de micronutrientes e agentes redutores e a microencapsulação, para elevar a taxa de sobrevivência desses microrganismos (BARRETO *et al.*, 2003; BERRADA *et al.*, 1991).

Dentre os produtos com fermentos lácteos disponíveis no mercado brasileiro encontram-se os produzidos com *Bifidobacterium animalis*, e a propaganda divulgada nos meios de comunicação de acesso ao público em geral é de que apresenta resistência ao passar pelo trato digestivo, garantindo sua funcionalidade de regular o trânsito intestinal. Este trabalho teve por objetivo verificar a sobrevivência da *Bifidobacterium* em fluido gástrico simulado após processo de industrialização de leite fermentado, de modo a garantir a função probiótica.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas três amostras de 100g de leite fermentado com informações no rótulo de que continham *Bifidobacterium animalis*. O produto foi adquirido em supermercado na cidade de Caçador (SC) com data de fabricação do dia 25 de abril de 2010 e válido até o dia cinco 5 de junho de 2010, sem número de lote. A escolha do produto teve como base o fato de apresentar no rótulo composição com propriedades funcionais. As amostras foram transportadas até o laboratório de microbiologia da Uniarp e mantidas em temperatura de 4°C a 5°C. As embalagens foram desinfetadas com álcool 70% e em seguida homogeneizadas. O conteúdo das amostras foi transferido para um becker esterilizado formando uma amostra única, também homogeneizada.

O produto *in natura* foi analisado numa amostra única com a retirada de uma alíquota, e realizou-se a fixação do material em lâmina, seguida de coloração de Gram. Para a diluição das amostras foi retirada uma alíquota de 10 mL do produto *in natura* e adicionado em 90 mL de água peptonada estéril. As diluições sucessivas até  $10^{-8}$  foram realizadas com 1mL da diluição anterior em 9 mL de água peptonada estéril. Foram inoculadas as diluições da amostra,  $10^{-1}$  até  $10^{-8}$  pelo método de espalhamento em superfície em placas contendo meio de cultura LA Ágar - Modified Bifidus Blood Ágar, em duplicatas. O método de inoculação em superfície foi realizado adicionando-se 100 µl da amostra com pipetador e ponteira esterilizada, no centro da placa, e espalhando o inóculo com o auxílio de uma alça de Drigalski estéril. As placas de Petry inoculadas foram incubadas em estufas com temperatura controlada em 37°C, em jarras de anaerobiose com atmosfera de CO<sub>2</sub> e indicador da presença deste gás por um período de 72 horas.

As colônias que cresceram no meio de cultivo LA Ágar foram diferenciadas pela coloração e forma: os lactobacilos em colônias planas, grandes e acinzentadas, e a *Bifidobacterium* em colônias elevadas, cor de chocolate. Em seguida, foi realizada a contagem das UFC nas diferentes diluições.

Para a simulação de meio gástrico, foram utilizadas 125g da amostra preparada conforme descrito anteriormente e adicionado 10mL de HCl 1,25N para ajuste de pH3, partindo do pH inicial da amostra (4,76). Para a avaliação em meio gástrico, o produto foi submetido a três diferentes medidas de tempo em pH3: zero (0), cinco (5) e 15 minutos. A partir destes tempos foram feitas diluições sucessivas utilizando como diluente 8,5mL de água peptonada mais 0,5mL de NaOH e 1 mL da diluição ( $10^{-1}$  até  $10^{-8}$ ). Todas as diluições foram inoculadas em placas de Petry com meio de cultivo LA Ágar, pelo método de espalhamento em superfície, em duplicatas. As placas foram acondicionadas em jarro de anaerobiose, aleatoriamente, e levadas à estufa por 72 horas à temperatura de 37°C. Após esse período, as colônias que cresceram no LA Ágar, foram diferenciadas pela coloração e forma conforme descrito anteriormente. A contagem das UFC foi realizada nas diluições  $10^{-5}$  a  $10^{-8}$ , as quais apresentaram condições favoráveis de leitura. Para confirmação das bactérias foi observada a morfologia, coloração de Gram e teste de catalase.

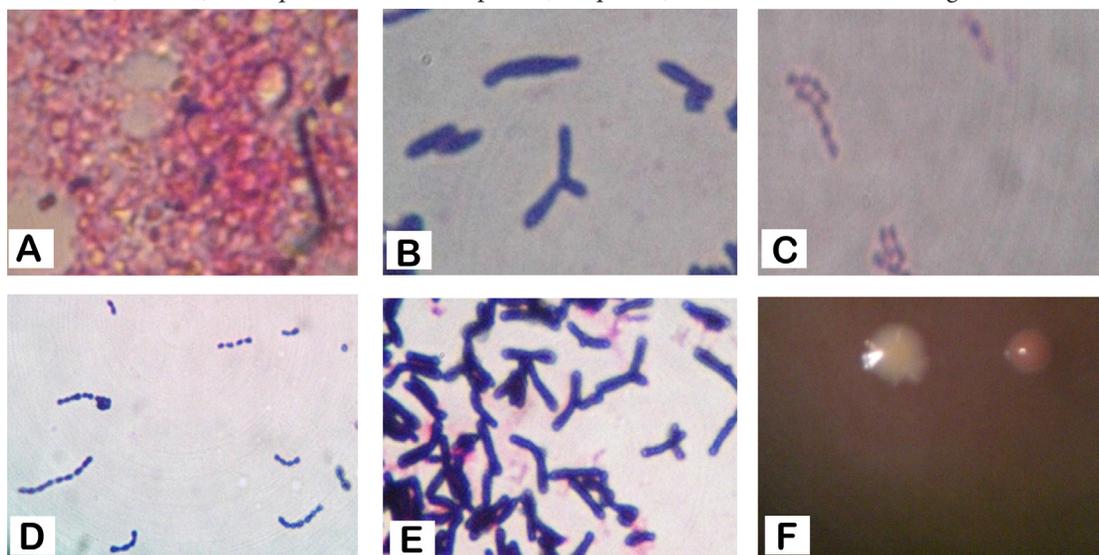
Foi realizada a análise fatorial da variância dos dados obtidos e submetidos à separação de médias pelo teste de Tuckey,  $p < 0,05$ . O delineamento experimental foi totalmente casualizado.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise microscópica do leite fermentado *in natura* pôde-se observar a presença de três microrganismos, conforme Figura 1, imagens “A”, “B” e “C”. O bacilo longo (1A), pela similitude morfológica sugere o *Lactobacillus bulgaricus*. O segundo, um bacilo de morfologia bifurcada em forma de Y e V, ou como bastonete apresentando uma das extremidades dilatadas, *Bifidobacterium* (1B) e o terceiro, cocos em forma de cadeia, espécie provável *Streptococcus thermophilus* (1C).

Figura 1- Bactérias lácticas presentes em leite fermentado *in natura*:

A) *Lactobacillus*, B) *Bifidobacterium* e C) *Streptococcus*; após o cultivo em placa em meio LA Ágar : D) *Streptococcus*, E) *Bifidobacterium*; F) *Bifidobacterium*, colônia de bactéria probiótica de tamanho menor e elevada (à direita) e *Streptococcus*, maior e plana (à esquerda) em cultivo no meio LA Ágar.



Fonte: Os autores.

Estes microrganismos são citados como componentes de produtos probióticos disponível no mercado, conforme monografia publicada pela (DANONE, s/d) e considerados probióticos pela legislação brasileira (BRASIL, 2005).

Quando o produto *in natura* foi inoculado em meio LA Ágar foi possível observar o crescimento de *Streptococcus* e *Bifidobacterium* (Figura 1D e 1E), confirmados pela análise microscópica de morfologia e coloração de GRAM. Após simulação em meio gástrico observou-se o crescimento diferenciado das colônias de *Streptococcus* e *Bifidobacterium* (Figura 1F), onde as colônias da primeira são maiores e planas; e da segunda, menores e elevadas. Também foi possível diferenciá-las pela coloração, pois as colônias de *Streptococcus* eram de coloração clara e de *Bifidobacterium*, de cor chocolate. A presença das bactérias probióticas foi confirmada também pela coloração de Gram e teste de catalase, comprovando ser Gram-Positivas e catalase negativas.

A quantificação das bactérias lácteas em meio LA Ágar do produto *in natura* analisado pode ser observada na tabela 1.

Tabela 1- População de bactérias lácteas em leite fermentado

Placas	UFC <sup>(1)</sup> /mL de leite fermentado
Placa 1	1,0 x 10 <sup>8</sup>
Placa 2	1,0 x 10 <sup>8</sup>
Média	1,0 x 10 <sup>8</sup>

<sup>(1)</sup> Unidade Formadora de Colônia. Médias de duas repetições.

Fonte: Os autores.

Segundo a legislação brasileira, a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10<sup>8</sup> a 10<sup>9</sup> UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo. Conforme Barreto e colaboradores (2003), o consumo diário de 200 a 400 mL contendo 5,0 x 10<sup>6</sup> UFC/mL corresponderia à quantidade indicada pela legislação. Como o produto em estudo do presente trabalho é veiculado em embalagens de 100g, enquadra-se nos parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira.

Pocharte e colaboradores (1992) avaliaram o uso de 400g de leite fermentado com *Bifidobacterium*, com consumo total de 10<sup>10</sup> UFC. Oito horas após a ingestão do leite fermentado, conseguiram recuperar em torno de 23,5% de *Bifidobacterium*, o que foi considerado uma quantidade significativa. Para 100g de leite fermentado, Charteris e colaboradores *apud* Lerayer, (2009, p. 169) sugerem a adição de 10<sup>9</sup> a 10<sup>10</sup> UFC.

Barreto e colaboradores (2003) observaram que os produtos que incorporam probióticos de maior interesse, como *L. acidophilus* e *Bifidobacterium*, apresentaram contagem de *L. acidophilus*, abaixo de 10<sup>5</sup> UFC/g em 52% das amostras e contagem de bifidobactérias abaixo de 10<sup>5</sup> UFC/g em 64% das amostras. A alegação para a perda de viabilidade dessas cepas não se mostrou relacionada ao tempo de estocagem do produto, mas como provável causa, a sensibilidade das condições do processo. Eles sugerem que para elevar a taxa de sobrevivência desses microrganismos são necessárias inovações tecnológicas como a seleção de cepas mais resistentes, pré-adaptação às condições de estresse, adição de micronutrientes e agentes redutores e a microencapsulação.

Quando o leite fermentado foi submetido a pH 3, simulando as condições em meio gástrico, em tempos de zero (0), cinco (5) e quinze (15) minutos, a população de bactérias probióticas sofreu um decréscimo de 7,4% nos cinco primeiros minutos e 28,34% após os quinze minutos (Tabela 2).

Tabela 2 – População de bactérias lácticas em diferentes tempos de permanência em ambiente gástrico simulado

Bactéria Probiótica	Tempo de permanência (minutos)			
	0	5	15	Média <sup>(a)</sup>
	UFC <sup>(b)</sup> /mL de leite fermentado x 10 <sup>7</sup>			
<i>Streptococcus</i>	29,0	27,0	19,0	25,0a
<i>Bifidobacterium</i>	3,0	3,0	4,0	3,3b
Média	16,0	15,0	11,5	14,2

<sup>(a)</sup> Médias de duas repetições submetidas ao teste de Tuckey ( $p \leq 0,05$ ). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si.

<sup>(b)</sup> Unidade Formadora de Colônia.

Fonte: Os autores.

A análise de variância foi significativa para o fator bactéria probiótica, mas não foi significativa para tempo de permanência no ambiente simulado e nem houve interação entre os fatores. Observou-se diferença entre as médias de UFC/mL entre as bactérias lácteas, e os valores obtidos foram de 25,0 x 10<sup>7</sup> de *Streptococcus* e 3,0 x 10<sup>7</sup> para *Bifidobacterium*.

Este crescimento superior de *Streptococcus* em relação à *Bifidobacterium* é esperado segundo Lerayer e colaboradores(2009), em função das exigências para o crescimento da última citada, tais como a exigência de nutrientes complexos e variáveis com relação a aminoácidos, peptídeos, vitaminas, sais minerais, ácidos graxos e açúcares fermentescíveis, além do seu crescimento ser em anaerobiose e com temperatura variável de 37°C a 40°C.

Estudos têm sido realizados com o objetivo de diminuir os efeitos da barreira química, pH do estômago sobre a população de *Bifidobacterium*. Lee e Heo (2000) testaram o efeito do encapsulamento da *Bifidobacterium* em alginato de cálcio e submeteram à simulação do suco gástrico e sais biliares. As concentrações de alginato de cálcio utilizadas foram de dois (2), três (3) e quatro (4) por cento e observou-se que a taxa de mortalidade das células decresceu proporcionalmente com o aumento do gel de alginato.

Crittenden e colaboradores (2006) testaram o microencapsulamento de *Bifidobacterium infantis* no interior de um filme contendo proteína, carboidrato e emulsão de óleo, com função prébiotica e de proteção da bactéria durante um período em relação ao trânsito gastrointestinal. As características destas cápsulas são de baixa atividade de água, de tamanho pequeno e de rápida dissolução da bactéria no fluido intestinal. Além desta proteção, observaram também que o encapsulamento de *B. infantis* protegeu o produto durante período de estocagem sem refrigeração e exposto a condições de oxigênio e umidade.

O uso de prébióticos associados aos probióticos tem comprovada eficiência por estimularem o crescimento dos microrganismos (GOMES; MALCATA, 1999). Portanto, inovações tecnológicas de produção podem contribuir positivamente para a melhoria da sobrevivência das bactérias probióticas em situações adversas.

A análise microbiológica do leite fermentado *in natura* e em fluido gástrico simulado confirmou a presença de população de bactérias probióticas de modo que possa trazer benefícios à saúde (BRASIL, 2005; PIMENTEL; FRANCKY; GOLLUCKE, 2005).

#### 4 CONCLUSÃO

Foram observadas as bactérias *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* em leite fermentado *in natura* e sobrevivência das duas primeiras bactérias em pH3 (ambiente gástrico simulado) após tempos de zero (0), cinco (5) e quinze (15) minutos. O leite fermentado apresentou bactérias probióticas em número de acordo com legislação vigente.

#### REFERÊNCIAS

- BARRETO, G. P. de M. *et al.* Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobactérias e Bactérias Totais em Produtos Probióticos Comercializados no Brasil. **Brazilian Journal Food Technology**, v.6, n.1, p.119-126, 2003.
- BERRADA, N. *et al.* Bifidobacterium from Fermented Milks: Survival During Gastric Transit. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.409-413, 1991.
- BRASIL. ANVISA. Resolução nº 278 de 22 de setembro de 2005. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde, 2005. Disponível em: <[http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/res0278\\_22\\_09\\_2005.html](http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/res0278_22_09_2005.html)>. Acesso em: 26 abr. 2012.
- CRITTENDEN, R. *et al.* Synbiotic Microcapsules That Enhance Microbial Viability during Nonrefrigerated Storage and Gastrointestinal Transit. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.3, p. 2280–2282, 2006.
- DANONE. Activia by Danone. Containing Bifidobacterium animalis (lactis). **Monograph for Health Care Professionals**, s/d.

GOMES, A.M.P.; MALCATA F.X. Bifidobacterium ssp. And Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutic properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v.10 p.139-157, 1999.

HOLT, J.G. *et al.* **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore: William e Wilkins, 1994.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. Trad. Eduardo Cesar Tondo *et al.* 6. Ed. Porto Alegre, 2005. 709p.

LERAYER, A. L.S. *et al.* Culturas lácticas e probióticas: identificação, classificação, detecção e aplicação tecnológica. In: OLIVEIRA, Maricê Nogueira de (Edi.). **Tecnologia de produtos lácteos funcionais**. São Paulo: Atheneu Editora, 2009. cap. 4, p. 125-186.

LEE, K.; HEO, T. Survival of Bifidobacterium longum Immobilized in Calcium Alginate Beads in Simulated Gastric Juices and Bile Salt Solution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 869-873, 2000.

PIMENTEL, C. V. B., FRANCKI, V.M., GOLLUCKE, A.P.B. **Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias Bioativas em alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2005. 95p.

POCHARTE, P. *et al.* Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 55, p.78-80, 1992.

SOUZA, J.S. de; SILVA. A. da. **Probióticos**, 2002. Disponível em: <<http://www.iogurte.com>>. Acesso em: 22 set 2009.

Recebido em 5 de maio de 2012

Aceito em 17 de maio de 2012

