

## AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE AUTO-AGREGAÇÃO, CO-AGREGAÇÃO E HIDROFOBICIDADE DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE DE CABRA *IN NATURA*

MARIA FERNANDA FERNANDES SIQUEIRA<sup>1</sup>; KHADIJA BEZERRA MASSAUT<sup>2</sup>; PÂMELA SILVA WOIGT<sup>3</sup>; WLADIMIR PADILHA DA SILVA<sup>4</sup>; GRACIELA VOLZ LOPES<sup>5</sup>; ÂNGELA MARIA FIORENTINI<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [maria.fernanda.fs97@gmail.com](mailto:maria.fernanda.fs97@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [khadijamassaut@gmail.com](mailto:khadijamassaut@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [paswoigt@gmail.com](mailto:paswoigt@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [wladimir.padilha2011@gmail.com](mailto:wladimir.padilha2011@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [gracielavlopes@yahoo.com.br](mailto:gracielavlopes@yahoo.com.br)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [angefiore@gmail.com](mailto:angefiore@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

Algumas bactérias ácido-láticas (BAL) podem possuir características que as enquadram no grupo de microrganismos probióticos, como a síntese de substâncias antimicrobianas, inibição da adesão e exclusão competitiva de patógenos, redução do colesterol, e produção de vitaminas como a vitamina B9, entre outras (MOSSO *et al.*, 2020). Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que quando administrados/ingeridos em uma quantidade adequada (6 – 7 log UFC.mL<sup>-1</sup>), conferem algum benefício à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; HILL *et al.*, 2014).

A prospecção de BAL, pode ser a partir de diversas matrizes alimentares, tendo em vista que esse grupo de microrganismos está presente naturalmente, em diversos alimentos, principalmente, os derivados lácteos artesanais e leite *in natura* (GUT *et al.*, 2019). Em um estudo realizado por Perin & Nero (2014), foi identificada uma predominância de cepas de *Lactococcus* e *Enterococcus* na microbiota do leite de cabra *in natura*.

A busca por bactérias probióticas, ainda não caracterizadas, tem sido foco de importantes pesquisas nas últimas décadas no campo da medicina, biotecnologia e indústria alimentícia (WIEËRS *et al.*, 2020). Portanto o objetivo do presente estudo, foi avaliar o potencial probiótico *in vitro* de bactérias ácido-láticas provenientes do leite de cabra *in natura*, através dos testes de auto-agregação, co-agregação e hidrofobicidade.

### 2. METODOLOGIA

Após *screening* de isolados de BAL, procedentes do leite de cabra *in natura*, submetidos a coloração de Gram, produção de catalase e testes de segurança microbiológica, quatro isolados (1, 2, 14, 21) passaram nos testes de avaliação de potencial probiótico como auto-agregação, co-agregação e hidrofobicidade.

Para a realização de todos os testes, foi preparada, inicialmente, uma suspensão em PBS, com as culturas ativas, com absorbância ajustada a 0,2 em um comprimento de onda de 600 nm (7- 8 log UFC. mL<sup>-1</sup>) (COLLADO *et al.*, 2008).

Para o teste de auto-agregação, as bactérias foram incubadas a 37 °C e 20 °C, e as leituras realizadas no tempo zero, 2 h, 20 h e 24 h, e os resultados foram expressos em percentual conforme a equação 1 (COLLADO *et al.*, 2008) [1 – (A<sub>600nm</sub> da suspensão final/ A<sub>600nm</sub> da suspensão inicial) x 100] equação – 1.

No teste de co-agregação, além dos isolados também foi utilizado *E. coli* ATCC 8739, sendo volumes iguais das suspensões de todos os microrganismos

misturados e, incubados a 37 °C. As leituras foram realizadas no tempo zero, 2 h, 4 h e 24 h e os resultados expressos em percentual, conforme a equação 2, onde  $A_{pat}$  e  $A_{iso}$  representam a absorvância do patógeno e do isolado respectivamente, enquanto  $A_{mix}$  representa a absorvância da mistura das suspensões (COLLADO *et al.*, 2008)  $\{[(A_{pat} + A_{isol}) / 2 - (A_{mix}) / (A_{pat} + A_{isol}) / 2] \times 100\}$  equação – 2.

A avaliação da hidrofobicidade foi realizada de acordo com Vinderola e Reinheimer (2003), com modificações. Onde a mistura de 3 mL da suspensão celular dos isolados adicionada de 400  $\mu$ L de xileno, foi agitada em vórtex por 1 minuto e, posteriormente, incubada a 37 °C. As leituras foram realizadas no tempo zero e 2 h, onde para leitura dos resultados foi coletada a fase aquosa da suspensão e os resultados foram expressos em percentual de adesão conforme a equação 3 onde  $A_0$  e  $A$  são as absorvâncias antes e depois da extração com xileno, respectivamente  $\{[(A_0 - A) / A] \times 100\}$  equação – 3.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os quatro isolados avaliados, o isolado 2 foi o que apresentou um maior percentual de auto-agregação (56,1%) a 20 °C, seguido do isolado 21, isolado 1 e isolado 14, respectivamente (40,4%, 37,7%, 28,2%) (Figura 1 A). Em contrapartida na avaliação da auto-agregação a 37 °C o isolado 14 foi o que apresentou um maior percentual (45,5%), seguido do isolado 21, isolado 2 e isolado 1 respectivamente (39,5%, 12,3%, 10,4%) (Figura 1 B).

Paixão (2016), relatou uma variação de capacidade de auto-agregação a 25 °C, de 58 isolados de bactérias ácido-láticas provenientes de leite de cabra, de 3,58% a 36,55%, com uma média de 18,55%, resultados inferiores ao encontrado no presente estudo. Essa capacidade pode permitir a interação do microrganismo com o hospedeiro e exercer efeitos benéficos (Garcia-Cayuela *et al.*, 2014), assim, considerando os resultados obtidos podemos dizer que os isolados em questão possuem uma capacidade de auto-agregação satisfatória, tendo em vista que para 20 °C a variação foi de 28,2% a 56,1% e a 37 °C de 10,4% a 39,5%.

Em relação a avaliação da capacidade de co-agregação o isolado 21 demonstrou o maior percentual (78,1%) seguido do isolado 14, isolado 2 e isolado 1 respectivamente (76,9%, 73,8%, 72,6%) (Figura 1 C). Paixão (2016), relatou uma capacidade média de co-agregação de 2,62% frente a *S. Typhimurium* ATCC 6539, 1,33% para *L. monocytogenes* ATCC 7644. Vitola *et al.* (2018), relataram uma variação de 47,37% a 57,1% frente a *E. coli* ATCC 8739 para isolados de BAL de silagem de colostro bovino, resultados que diferem dos encontrados no presente estudo, tendo em vista que a capacidade de co-agregação dos isolados em questão variou de 72,6% a 78,6%, valores superiores aos demais estudos.

Resultados com valores elevados de auto-agregação e co-agregação, são de extrema relevância para a prospecção de novos microrganismos quando o foco é o potencial probiótico, tendo em vista que ambas características favorecem a adesão desses microrganismos ao epitélio intestinal e a formação de barreiras que impedem a colonização por microrganismos patogênicos (DEL-RE *et al.*, 2000).

Entre os quatro isolados avaliados, o que apresentou uma maior hidrofobicidade ao final de 2 h foi o isolado 21 (99,8%), seguido do isolado 1, isolado 2 e 14 respectivamente (87,0%, 86,4%, 76,9%) (Figura 1D). A hidrofobicidade de um isolado, compreende a capacidade de adesão a um hidrocarboneto, e estima a forma como a bactéria se ligaria às células epiteliais do hospedeiro. Elevados valores de hidrofobicidade indicam uma maior capacidade de adesão às células epiteliais (TODOROV *et al.*, 2011).

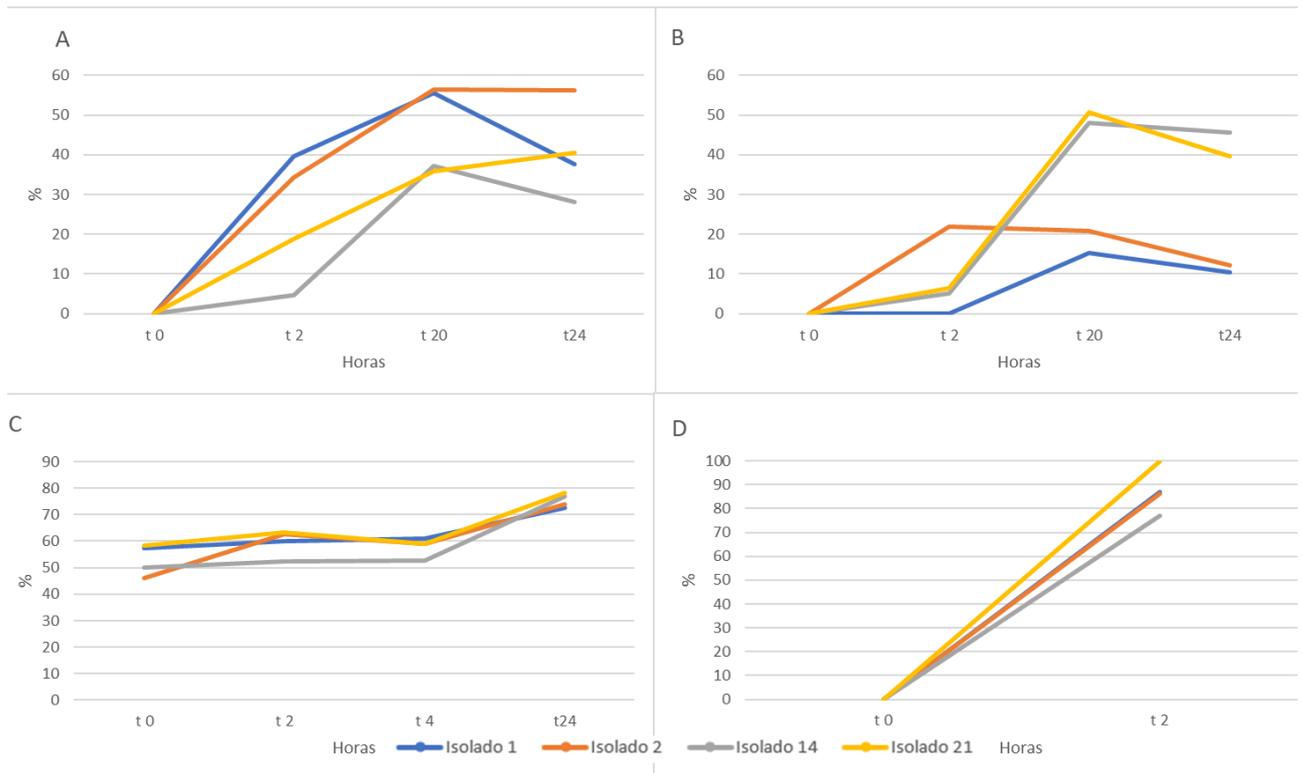


Figura 1 Resultados da avaliação da capacidade de auto-agregação a 20°C (A), auto-agregação a 37 °C (B) co-agregação (C) e hidrofobicidade (D) de isolados de bactérias ácido-láticas provenientes de leite de cabra *in natura*

#### 4. CONCLUSÕES

Todos os isolados avaliados no presente estudo apresentaram capacidade de auto-agregação, co-agregação e hidrofobicidade relevantes, sugerindo um significativo potencial de adesão às células epiteliais, e podem ser considerados potencialmente probióticos. Entretanto, mais testes ainda devem ser realizados, como tolerância ao trânsito gastrointestinal e citotoxicidade.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J. & SALMINEN, S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. **European Food Research and Technology**, v.226(5), p.1065–1073, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0632-x>
- FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of United Nations; World Health Organization. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001.
- GARCIA, R. V.; TRAVASSOS, A. E. R. Aspectos gerais sobre o leite de cabra: uma revisão. **Rev. Inst. Latic.** v.386, n.67, p.81-88, 2012.
- GARCÍA-CAYUELA, T.; KORANY, A. M.; BUSTOS, I.; GÓMEZ DE CALDINANOS, L. P.; REQUENA, T.; PELAEZ, C.; MARTINEZ-CUESTA, M. C. Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. **Food Research International**, v.57, p.44-50, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.010>
- GUT, A. M.; VASILJEVIC, T.; YEAGER, T.; DONKOR, O. N. Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties. **Journal of Functional Foods**, v. 58, p. 56-66, 2019.

- HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; Pot, B. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepato**, v.11, p. 506–514, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- LEVIT, R.; SAVOY DE GIORI, G.; DE MORENO DE LEBLANC, A.; LEBLANC, J. G. Recent update on lactic acid bacteria producing riboflavin and folates: application for food fortification and treatment of intestinal inflammation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 5, p. 1412-1424, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14854>
- MOKOENA, M. P. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1-13, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>
- MOSSO, A. L.; LEBLANC, J. G.; MOTTA, C.; CASTANHEIRA, I.; RIBOTTA, P.; SAMMÁN, N. Effect of fermentation in nutritional, textural and sensorial parameters of vegan-spread products using a probiotic folate-producing *Lactobacillus sakei* strain. **Food Science and Technology**, v.127, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109339>
- PAIXÃO, I. S. F. Caracterização de bactérias ácido lácticas autóctones de leite de cabra e sua funcionalidade no queijo coalho caprino artesanal. 2016. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Federal do Vale do São Francisco.
- PERIN, L. M.; NERO, L. A. Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. **BMC microbiol.** v.14, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-36>
- TODOROV, S. D., FURTADO, D. N., SAAD, S. M. I., TOME, E., FRANCO, B. D. G. M. Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. **Journal of Applied Microbiology**, v.110(4), 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04950.x>
- 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(9–10), p.895–904, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00098-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00098-X)
- VITOLA, H. R. S., DANNENBERG, G. S., MARQUES, J. L., LOPES, G. V., SILVA, W. P., FIORENTINI, A. M. Probiotic potential of *Lactobacillus casei* CSL3 isolated from bovine colostrum silage and its viability capacity immobilized in soybean. **Process Biochemistry**, v. 75, p.20-30, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.09.011>
- WIEËRS, G., BELKHIR, L.; ENAUD, R., LECLERCQ, S., FOY, J. M. P., DEQUENNE, I., TIMARY, P., CANI, P. D. How Probiotics Affect the Microbiota. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 454, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00454>