

AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DA CAPACIDADE DE SÍNTESE DE FOLATO POR BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS

MARIA FERNANDA FERNANDES SIQUEIRA¹; KHADIJA BEZERRA MASSAUT²; PEDRO FERNANDES VIANA³; GRACIELA VOLZ LOPES⁴; WLADIMIR PADILHA DA SILVA⁵; ÂNGELA MARIA FIORENTINI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – maria.fernanda.fs97@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – khadijamassaut@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fernandes199921@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – gracielavlopes@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – angefiore@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O grupo das bactérias ácido-láticas (BAL) é composto por microrganismos que apresentam características morfológicas e fisiológicas em comum, não são esporuladas, são catalase negativa e Gram-positivas, podem apresentar morfologia de cocos ou bacilos e produzem ácido lático como principal produto da fermentação de carboidratos (LEVIT *et al.*, 2021). As BAL são consideradas GRAS (*Generally Reconized as Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*), e devido a isso são utilizadas como culturas iniciadoras em processos fermentativos em indústrias do setor alimentício (MOJGANI *et al.*, 2015).

Algumas BAL apresentam propriedades probióticas, beneficiando a saúde do hospedeiro, bem como, ao longo do processo fermentativo têm a capacidade de produzir alguns metabólitos de interesse como peptídeos bioativos, ácidos graxos de cadeia curta (RAFIQUE *et al.*, 2023) e vitaminas A, K e do grupo B (PELUZIO *et al.*, 2021).

Entre as vitaminas que as BAL sintetizam podemos destacar a vitamina B9, também denominada de folato, que é considerado um micronutriente essencial para a manutenção do metabolismo (PFEIFFER *et al.*, 2005). O folato pode variar conforme o seu estado de oxidação e também de acordo com o grupo carbono ligado nas posições N5 e N10 do anel de pteridina (SERRANO-AMATRIAIN *et al.*, 2016; SAUBADE *et al.*, 2016).

A deficiência em folato pode acarretar alguns distúrbios de saúde (MAYNARD *et al.*, 2018), como diminuição da capacidade cognitiva e anemia, assim como a deficiência materna pode resultar na má formação do tubo neural (LUCOCK, 2000; DALY *et al.*, 1995), sendo a recomendação diária para indivíduos adultos o consumo de 400 µg de folato (FAO/ WHO, 2004). Em virtude da incidência de indivíduos com deficiência dessa vitamina, muitos países incluindo o Brasil, preconizam a fortificação de farinhas com ácido fólico (forma sintética do folato) (BRASIL, 2022). Entretanto, alguns estudos levantam o questionamento sobre o metabolismo e absorção do ácido fólico (MAYNARD *et al.*, 2018), bem como o seu acúmulo substancial (STRICKLAND *et al.*, 2013), que ocorre no fígado, devido ao fato de ser o órgão de armazenamento da vitamina (ZHANG *et al.*, 2022).

Nesse contexto, o objetivo foi avaliar fenotipicamente a capacidade de síntese de folato por isolados de bactérias ácido-láticas.

2. METODOLOGIA

Para a realização da avaliação da capacidade de produção de folato foram utilizados ao todo sete isolados, da coleção de culturas iniciadoras e probióticas do Laboratório de Processamento de Produtos de Origem Animal (LPOA), sendo

Weissella cibaria C28, *W. cibaria* C34 (isolados de sushi), *Lacticaseibacillus casei* CSL16 (isolado de silagem de colostro bovino), *Pediococcus pentosaceus* P97 e *Latilactobacillus curvatus* P99 (isolados de presunto) e *Enterococcus thailandicus* F1 e *Lactobacillus* sp. H7 (isolados de kefir).

Os isolados foram avaliados quando a sua capacidade de multiplicação por sete vezes consecutivas em meio FACM (*Folic Acid Casei Medium*) (LAIÑO *et al.*, 2012). Os isolados que foram capazes de passar pelas sete lavagens em FACM foram considerados fenotipicamente, capazes de sintetizar folato. Na terceira e sétima lavagem foram coletadas alíquotas para a quantificação de folato extracelular e intracelular, através do método microbiológico.

O meio de cultura da lavagem 3 e da lavagem 7 foi aliqüotado em *ependorf* e após foi adicionado 1/1 v/v de solução tampão fosfato 0,1 M pH 6,6-6,8. O preparo das frações extracelular e intracelular seguiu o protocolo proposto por LAIÑO *et al* (2012), onde após a adição do tampão, os *ependorfs* foram centrifugados a 5.000 g por cinco minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo *ependorf* (fração extracelular). Os *ependorfs* que ficaram com o *pellet* tiveram o mesmo ressuspendido na solução tampão com igual volume adicionado antes da centrifugação (fração intracelular). Já a quantificação seguiu o protocolo proposto por HORNE e PETERSON (1998), onde a cepa ATCC 7469 *Lacticaseibacillus rhamnosus* foi utilizada como indicadora da presença de folato no meio, onde a cepa passou por 2 lavagens em meio FACM e após 4% do último cultivo foi inoculado em um novo caldo com 2XFACM, as frações extracelular e intracelular foram aliqüotados (100 µL) em triplicata em uma placa de 96 poços, e juntamente foi adicionado 100 µL em cada poço da suspensão da cepa ATCC 7469 *L. rhamnosus* em 2XFACM. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Os resultados foram expressos em absorbância a 580 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

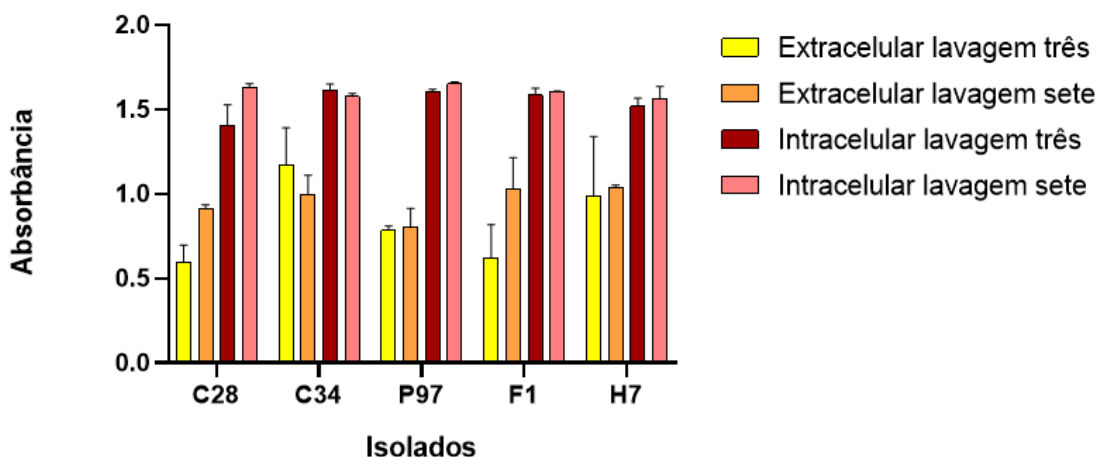
Ao todo, cinco dos sete isolados apresentaram a capacidade de multiplicação ao longo das sete lavagens em meio FACM. Os resultados obtidos da avaliação da capacidade de multiplicação da cepa *L. rhamnosus* ATCC 7469, estão apresentados na Figura 1. Todas as frações extracelular e intracelular de ambas as lavagens, possuem folato, levando em consideração que a cepa indicadora apresentou capacidade de multiplicação em todas as amostras avaliadas.

Dentre os isolados avaliados, os que se destacaram quanto a capacidade de síntese de folato foram *P. pentosaceus* P97 e *W. cibaria* C28 com as maiores absorbâncias apresentadas de 1,653 e 1,629 respectivamente, para a fração intracelular da lavagem sete. Ao analisarmos a produção de folato extracelular o isolado que se destacou foi *Lactobacillus* sp. H7 apresentando absorbância de 1,037 na fração da lavagem sete.

Em um estudo conduzido por SALVUCCI *et al* (2016) diversas cepas de BAL foram avaliadas com capacidade de síntese de folato, dentre elas *Pediococcus pentosaceus* ES110 isolado de farinha integral. Os autores também identificaram a capacidade de síntese de folato entre as espécies de *Enterococcus mundtii*, *Lactobacillus pentosus*, *P. acidilactici*, *E. faecalis*, *Limosilactobacillus fermentum*, *E. gallinarum* e *Levilactobacillus brevis*, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo. Já DEATRAKSA *et al* (2018) avaliaram a capacidade de produção de folato de isolados de *Weissella cibaria* e *W. confusa* de peixe fermentado e todos os isolados avaliados produziram folato, resultado também encontrado no presente estudo.

Em relação à capacidade de síntese de folato por BAL é importante ressaltar que a mesma é cepa-dependente (GREPPI *et al.*, 2017).

Figura 1. Resultados obtidos das frações extracelular e Intracelular das lavagens três e sete em FACM de isolados de bactérias ácido- lácticas utilizando a cepa indicadora ATCC 7469 *Lacticaseibacillus rhamnosus*



(C28) *Weissella cibaria*; (C34) *Weissella cibaria*; (P97) *Pediococcus pentosaceus*; (F1) *Enterococcus thaulandicus*; (H7) *Lactobacillus* sp.

Fonte: Autores 2024

4. CONCLUSÕES

As bactérias ácido-láticas prospectadas de diferentes matrizes alimentares possuem potencial de síntese de folato, podendo ser consideradas para aplicação como microrganismos fermentadores para obtenção de produtos bioenriquecidos com folato.

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA Resolução RDC n.640 de 10 de fevereiro de 2022. Dispõe sobre o enriquecimento obrigatório do sal com iodo e das farinhas de trigo e de milho com ferro e ácido fólico destinados ao consumo humano. Diário Oficial da União, Poder executivo, Brasília, DF, fevereiro de 2022.

DALY, L. E.; KIRKE, P. N.; MOLLY, A. Folate levels and neural tube defects. **JAMA**, 1995.

DEATRAKSA, J.; SUNTHORNTHUMMAS, S.; RANGSIRUJI, A.; SARAWANEEYARUK, S.; SUWANNASAI, N.; PRINGSULAKA, O. Isolation of folate-producing *Weissella* spp. from Thai fermented fish (Plaa Som Fug). **LWT**, vol. 89, p. 388–391, 2018.

- FAO/WHO. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. (2nd ed.), Bangkok, Thailand, 2004.
- GREPPI, A.; HEMERY, Y.; BERRAZAGA, I.; ALMAKSOUR, Z.; HUMBLLOT, C. Ability of lactobacilli isolated from traditional cereal-based fermented food to produce folate in culture media under different growth conditions. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, vol. 86, p. 277–284, 2017.
- HORNE, D. W.; PATTERSON, D. *Lactobacillus casei* microbiological assay of folic acid derivatives in 96-well microtiter plates. **Clinical Chemistry**, vol. 34, no. 11, p. 2357–2359, 1988.
- LAIÑO, J. E.; LEBLANC, J. G.; SAVOY DE GIORI, G. Production of natural folates by lactic acid bacteria starter cultures isolated from artisanal Argentinean yogurts. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 581–588, maio 2012.
- LEVIT, R.; SAVOY DE GIORI, G.; 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**, vol. 130, no. 5, p. 1412–1424, 2021.
- LUCOCK, M. Folic Acid: Nutritional Biochemistry, Molecular Biology, and Role in Disease Processes. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 71, n. 1-2, p. 121–138, set. 2000.
- MAYNARD, C.; CUMMINS, I.; GREEN, J.; WEINKOVE, D. A bacterial route for folic acid supplementation. **BMC Biology**, vol. 16, p. 67, 2018.
- MOJGANI, N.; HUSSAINI, F.; VASEJI, N. Characterization of Indigenous *Lactobacillus* Strains for Probiotic Properties. Jundishapur **Journal of Microbiology**, vol. 8, no. 2, 2015.
- PELUZIO, M. do C. G.; MARTINEZ, J. A.; MILAGRO, F. I. Postbiotics: Metabolites and Mechanisms Involved in microbiota-host Interactions. **Trends in Food Science & Technology**, vol. 108, p. 11–26, 2021.
- PFEIFFER, C. M.; CAUDILL, S. P.; GUNTER, E. W.; OSTERLOH, J.; SAMPSON, E. J. Biochemical indicators of B vitamin status in the US population after folic acid fortification: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000. **The American Journal of Clinical Nutrition**, vol. 82, no. 2, p. 442–450. 2005.
- RAFIQUE, N.; JAN, S.; DAR, A. H.; DASH, K. K.; SARKAR, A.; SHAMS, R.; PANDEY, V. K.; KHAN, S. A.; QURAAZAH AKEEMU AMIN; SYED ZAMEER HUSSAIN. Promising bioactivities of postbiotics: A comprehensive review. **Journal of agriculture and food research**, vol. 14, p. 100708–100708. 2023.
- SALVUCCI, E.; JEAN GUY LEBLANC; PÉREZ, G. T. Technological properties of Lactic acid bacteria isolated from raw cereal material. v. 70, p. 185–191, 1 jul. 2016.
- SAUBADE, F.; HEMERY, Y. M.; GUYOT, J.-P.; HUMBLLOT, C. Lactic acid fermentation as a tool for increasing the folate content of foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, vol. 57, no. 18, p. 3894–3910, 2017.
- SERRANO-AMATRIAIN, C.; LEDESMA-AMARO, R.; LÓPEZ-NICOLÁS, R.; ROS, G.; JIMÉNEZ, A.; REVUELTA, J. L. Folic Acid Production by Engineered *Ashbya gossypii*. **Metabolic Engineering**, vol. 38, p. 473–482, 2016.
- STRICKLAND, K. C.; KRUPENKO, N. I.; KRUPENKO, S. A. Molecular mechanisms underlying the potentially adverse effects of folate. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, vol. 51, no. 3, 2013.
- ZHANG, H.; ZUO, Y.; ZHAO, H.; WANG, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, J.; WANG, P.; SUN, L.; ZHANG, H.; LIANG, H. Folic acid ameliorates alcohol-induced liver injury via gut-liver axis homeostasis. **Frontiers in Nutrition**, v.9, 2022.