

EFEITO DE ESTRESSE SUBLETAL PELO FRIO EM CÉLULAS DE *Lactobacillus rhamnosus* GG EM SUCO MISTO DE JUÇARA E MANGA.

Maria Paula Jensen Rodrigues

Thamiris Cabrini Ventura Dias

José Manoel Martins

Maurilio Lopes Martins ✉

Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais. Rio Pomba, MG.

✉ maurilio.martins@ifsudestemg.edu.br

RESUMO

Lactobacillus rhamnosus GG é uma bactéria probiótica, Gram-positiva, não esporulada, catalase negativa, microaerofílica e não fermentadora de lactose. Assim, produtos lácteos fermentados não são bons carreadores desse micro-organismo, mas, produtos de origem vegetal, como sucos, podem veicular essa bactéria. Entretanto, a acidez desses alimentos pode inibir a viabilidade de probióticos. Por outro lado, a exposição de micro-organismos a um estresse prévio subletal faz com que ocorra a ativação de mecanismos celulares regulatórios e os mesmos quando expostos a uma condição de estresse subletal previamente são mais resistentes às condições de estresse subsequentes. Neste trabalho avaliou-se o estresse subletal pelo frio em células de *L. rhamnosus* GG em suco misto de juçara e manga durante 60 dias de armazenamento a 7 °C. Foram realizados dois tratamentos sendo eles, controle e estresse

subletal pelo frio no qual *L. rhamnosus* GG foi armazenado a 4 °C por sete dias em caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS). Após, a centrifugação foi realizada e o pellet de células foi inoculado em suco misto de juçara e manga. A análise de viabilidade por plaqueamento foi realizada nos tempos 0, 7, 14, 21, 28, 45 e 60 dias em ágar MRS. Com 28 dias de armazenamento houve redução de 0,59 ciclo logaritmico na contagem para o tratamento controle e 0,80 ciclo logaritmico para o tratamento em que as células passaram pelo estresse subletal pelo frio e com 60 dias houve redução da contagem do tratamento controle de 1,69 ciclo logaritmico e para o tratamento de estresse subletal de 1,9 ciclo logaritmico. Dessa forma, o estresse subletal pelo frio aplicado não foi suficiente para ativar os mecanismos de resposta ao estresse em *L. rhamnosus* GG quando veiculado em suco misto de juçara e manga.

Palavras-chave: Alimento funcional. Frutas tropicais. Probiótico.

ABSTRACT

Lactobacillus rhamnosus GG is a probiotic, Gram-positive, non-spore forming, catalase-negative, microaerophilic and non-fermenting lactose bacterium. Therefore, fermented dairy products are not good carriers of this microorganism, so products of vegetable origin, such as juices, can vehicle this probiotic. However, the acidity present can inhibit the viability of probiotic microorganisms. On the other hand, the exposure of microorganisms to a previous sublethal stress causes the activation of regulatory cellular mechanisms. Therefore, microorganisms that are exposed to a sublethal stress condition previously are more resistant. This work evaluated the sublethal cold stress in *L. rhamnosus* GG cells in mixed juçara and mango juice for 60 days at 7 °C. Two treatments were carried out, being control and sublethal cold stress in which *L. rhamnosus* GG

*was stored at 4 °C for seven days in Man Rogosa Sharpe broth (MRS). After centrifugation, the cell pellet was inoculated in mixed juçara and mango juice. The viability analysis by plating was performed at times 0, 7, 14, 21, 28, 45 and 60 days. With 28 days of storage there was a reduction of 0.59 logarithmic cycle for the control and 0.80 logarithmic cycle for the treatment of sublethal stress, and with 60 days the count of *L. rhamnosus* GG in the control treatment reduced 1.69 logarithmic cycle and 1.9 logarithmic cycle for the treatment of sublethal stress. Thus, the application of sublethal stress by cold was not enough to activate the mechanisms of stress response in *L. rhamnosus* GG when served by mixed juçara and mango juice.*

Keywords: *Functional food. Tropical fruits. Probiotic.*

INTRODUÇÃO

A busca por alimentos funcionais vem se intensificando, uma vez que estes conferem benefícios à saúde do consumidor, como a melhoria das funções fisiológicas, aumento do valor nutricional dos alimentos, auxílio no equilíbrio e atividade da microbiota intestinal, bem-estar, saúde e também por reduzirem o risco de algumas doenças (SAAD, 2006).

Dentre os alimentos funcionais destacam-se os probióticos, que são definidos como micro-organismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). Os alimentos carreadores de probióticos mais comuns são os de base láctea, entretanto, com o aumento da intolerância à lactose, alergia à proteína do leite e o veganismo crescente, a indústria de alimentos vem buscando alternativas de alimentos veiculadores desses

micro-organismos (MARTINS et al., 2015) e, assim, tem-se a opção de inclusão dos sucos probióticos no mercado brasileiro.

O mercado nacional de sucos prontos está em crescimento, acompanhando a tendência mundial de consumo de bebidas saudáveis, convenientes e saborosas que trazem inúmeros benefícios. Sucos de fruta prontos são considerados bebidas refrescantes e práticas, o que contribui para sua aceitação (FERREIRA; AL-CÂNTARA, 2013).

Em 2012 a produção de sucos e néctares chegou a 987 milhões de litros apresentando crescimento de 10% quando comparado com as demais bebidas não alcoólicas como refrigerantes, sucos em pó e sucos concentrados (ABIR, 2012). Esta tendência de consumir sucos de frutas acompanha uma tendência mundial, o que leva as indústrias a produzirem bebidas saudáveis e com sabor agradável (MAMEDE et al., 2013).

No entanto, a acidez presente no suco é uma barreira para o desenvolvimento e manutenção da viabilidade dos micro-organismos probióticos que são considerados ingredientes funcionais. Portanto, mecanismos que garantam a sobrevivência destes nos sucos estão sendo estudados, como o efeito do estresse subletal aplicado às células (PRATES, 2017). Sabe-se que expondo os micro-organismos a um estresse subletal prévio, os mesmos passam a se adequar às adversidades do meio mais facilmente do que àqueles que não passaram pelo estresse subletal, o que se deve a expressão gênica diferenciada que o estresse subletal proporciona nos micro-organismos (PERRICONE et al., 2014; REALE et al., 2015).

Neste trabalho objetivou-se avaliar o efeito do estresse subletal pelo frio em células de *Lactobacillus rhamnosus* GG, uma das bactérias probióticas mais estudadas recentemente devido a sua funcionalidade e

robustez tecnológica em suco misto de juçara e manga.

MATERIAL E MÉTODOS

Três lotes de polpa de manga foram preparados por Prates (2017), a partir da seleção de frutas adquiridas no comércio da cidade de Barbacena-MG. Foram selecionadas frutas maduras de manga da cultivar Palmer e levadas a unidade de processamento de vegetais de um supermercado, localizado em Barbacena-MG, onde a polpa foi processada. As frutas foram lavadas individualmente com água potável e detergente neutro, com o objetivo de eliminar as sujidades provenientes do campo. Logo após, foram enxaguadas e sanitizadas em solução clorada sanificante para frutas (KITCHEN SANIT CLOR, registro ANVISA nº 342550028) conforme instrução do fabricante, para redução da contagem de micro-organismos contaminantes a níveis seguros, e então foram enxaguadas em água potável (PRATES, 2017). Em seguida, as frutas foram descascadas e cortadas, sendo o caroço removido e os cortes triturados em liquidificador industrial (LS-03MB-N 3L Inox Skymssen). A polpa obtida foi fracionada em embalagens de polietileno de baixa densidade contendo 100 ± 5 g e congelada a -18 °C para posterior preparo do suco.

A polpa de juçara congelada foi adquirida de um produtor local do município de Rio Pomba-MG, em embalagens de polietileno de baixa densidade. As polpas foram mantidas a -18 °C e transportadas em caixas com isolamento térmico até o Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do IF Sudeste MG, campus Rio Pomba, para armazenagem em freezer a -20 °C.

Para elaboração do suco misto as polpas de manga e juçara foram descongeladas sob refrigeração por 6 horas a 7 °C, sendo então trituradas

na proporção de 70% de juçara e 30% de manga com adição de 7% de açúcar em relação à quantidade de suco desejado em liquidificador por 15 minutos. O pH do suco foi ajustado para 4,0 utilizando solução de ácido cítrico 5%. O suco misto foi envasado em frascos de vidro estéreis de 100 mL e pasteurizados em banho-maria a 82 °C por 1 minuto (MOREIRA et al., 2017). A

temperatura foi acompanhada utilizando um frasco aberto com suco onde estava inserido um termômetro. Após o tratamento térmico o suco foi resfriado a 28 °C.

De modo a submeter às células de *L. rhamnosus* GG ao estresse subletal pelo frio, o conteúdo de uma capsula dessa cultura (Culturelle®) contendo 10^{10} UFC/g foi ativado em 10 mL de caldo de Man Rogosa Sharpe (Merck,

Darmstadt, Alemanha - MRS) a 37 °C até que a mesma alcançasse absorvância de 0,2 a 0,3 a 600 nm, em espectrofotômetro (BEL® PHOTONICS, SP 2000UV). Posteriormente, a cultura foi diluída 100 vezes em 5 mL de caldo MRS, distribuído em cinco tubos a fim de se obter um volume final de 25 mL para a condição de estresse subletal pelo frio (incubação a 4 °C por 7 dias). Após

Figura 1 - Contagem média (n=3) de *L. rhamnosus* GG ao longo do tempo quando não submetido (controle) e submetido ao estresse subletal a 4,0 °C por sete dias em suco misto de juçara e manga.

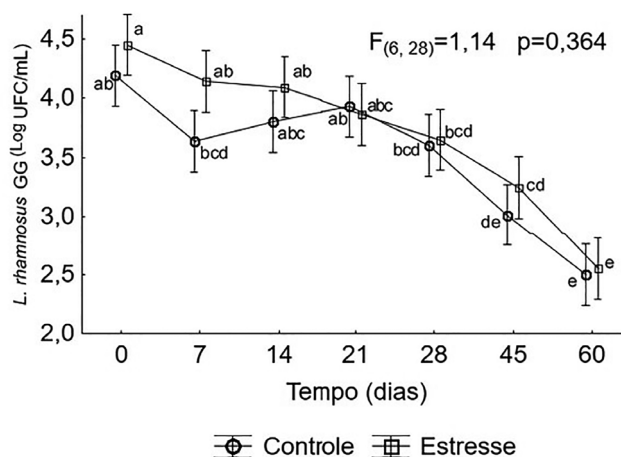
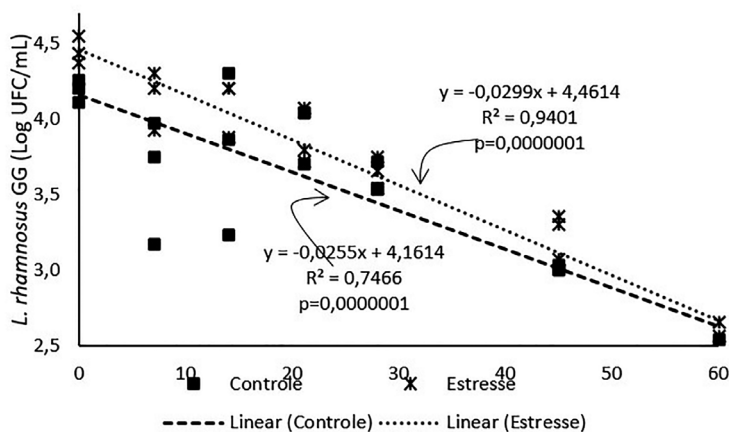


Figura 2 - Regressão linear da viabilidade de *L. rhamnosus* GG quando não submetido (controle) e submetido ao estresse subletal a 4,0 °C por sete dias em suco misto de juçara e manga.



a aplicação do estresse subletal, as células foram coletadas por centrifugação (5 °C/15 min./8500 RPM) (Thermo Fisher Scientific, Sorvall™ Stratos™ Centrifuge Series, Alemanha), suspensas em água peptonada (0,1%) esterilizada, centrifugadas novamente nas condições descritas previamente, sendo o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 10 mL de suco misto de juçara e manga pasteurizado.

A viabilidade celular durante o período de armazenamento foi avaliada por 60 dias (0, 7, 14, 21, 28, 45 e 60). Para isso, alíquotas do suco misto pasteurizado contendo a cultura probiótica foram utilizadas para determinar o número de células viáveis de *L. rhamnosus* GG. O plaqueamento foi feito por profundidade em Ágar MRS com posterior incubação em jaras de anaerobiose a 37 °C. O experimento foi acompanhado de suco controle, em que *L. rhamnosus* GG não foi submetido ao tratamento de estresse subletal. Posteriormente, foram construídas as curvas de sobreviventes para cada condição experimental.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostraram que não houve interação entre tempo e tratamento ($p>0,05$). Entretanto, houve diferença ao longo do tempo ($p<0,05$) para os dois tratamentos.

O estresse subletal pelo frio não foi suficiente para ativar o mecanismo de resposta celular e, consequentemente induzir a expressão das proteínas do choque frio em células de *L. rhamnosus* GG. Até 21 dias de armazenamento não houve redução da contagem de *L. rhamnosus* GG, entretanto, a partir de 28 dias houve redução da contagem que se intensificou no tempo 60 (Figura 1).

Furtado (2017), em estudo realizado para avaliar a viabilidade de probióticos em suco tropical de manga,

constatou que aos 28 dias de armazenamento refrigerado a contagem de *L. rhamnosus* GG estava acima de 7,96 Log UFC/mL, sugerindo que seu produto poderia ser considerado probiótico. Entretanto, no presente trabalho o intuito foi de apenas avaliar a influência da adaptação prévia de *L. rhamnosus* GG quando exposto ao estresse frio e a subsequente sobrevivência no suco de juçara e manga e não de obter um produto probiótico.

Moreira et al. (2017) também constataram que, após 30 dias de armazenamento de suco misto de juçara e manga a 4 °C, houve um aumento de 0,7 ciclo logaritmico na contagem de *L. rhamnosus* GG, diferente do encontrado no presente estudo.

Pires (2016) avaliou a viabilidade de *L. rhamnosus* GG em suco misto de juçara e abacaxi e verificou que ao final de 28 dias de armazenamento as contagens de *L. rhamnosus* GG no suco era de 6,81 Log UFC/mL, confirmando a possibilidade de se utilizar suco misto de juçara e abacaxi como carreador de micro-organismos probióticos. Campos (2016) também estudou a viabilidade de *L. rhamnosus* GG em suco misto de juçara e abacaxi e verificou a viabilidade deste micro-organismo ao longo de 28 dias de armazenamento, que foi de 7,2 Log UFC/mL.

A influência de estresse ácido subletal em *L. rhamnosus* GG inoculado em suco misto de juçara e manga foi avaliada por Prates (2017). A autora constatou que até os 28 dias de armazenamento o estresse não foi suficiente para induzir a resposta gênica nas células. Foi avaliado ainda a influência do estresse bórico em *L. rhamnosus* GG e verificou-se que o tratamento com aplicação de pressão de 200 MPa foi suficiente para manter a viabilidade das células durante 90 dias de armazenamento.

Perricone et al. (2014) relataram que a viabilidade das culturas

probióticas em sucos de frutas pode ser aumentada por adaptação e indução de resistência expondo os probióticos ao estresse subletal que poderia induzir resistência e uma resposta ao estresse futuro. Entretanto, neste trabalho, o estresse subletal pelo frio não foi suficiente para induzir a resposta celular em *L. rhamnosus* GG quando mantido em suco de juçara e manga.

Nesse trabalho o modelo de regressão ajustado foi linear negativo, ou seja, com o aumento do tempo de armazenamento houve redução significativa da viabilidade de *L. rhamnosus* GG em suco de juçara e manga (Figura 2).

De Oliveira (2017) avaliou a viabilidade de *L. rhamnosus* GG em suco de jabuticaba, em que as frutas passaram ou não por branqueamento. O tratamento sem branqueamento favoreceu o crescimento de *L. rhamnosus* GG e ao final de 28 dias de armazenamento, o suco apresentou contagens de 6,05 Log UFC/mL. Já o tratamento em que as frutas passaram por branqueamento, *L. rhamnosus* GG foi inibido apresentando contagens de 1,81 log UFC/mL. A autora justifica esse baixo crescimento devido à liberação de compostos fenólicos encontrados na jabuticaba que são inibidores de micro-organismos.

CONCLUSÃO

O estresse subletal pelo frio aplicado nesse estudo não foi suficiente para ativar o mecanismo de resposta celular e proteínas do choque frio em células de *L. rhamnosus* GG quando veiculado em suco misto de juçara e manga, uma vez que não houve diferença significativa entre os tratamentos controle e de estresse subletal pelo frio ao longo do tempo de armazenamento.

Sugere-se que mais trabalhos como este sejam realizados empregando-se contagem inicial de *L.*

rhamnosus GG mais elevada e que diferentes temperaturas e tempos de armazenamento sejam avaliados.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE REFRIGERANTES E DE BEBIDAS NÃO ALCÓOLICAS, ABIR. **A produção de sucos e néctares cresceu 10%**. 2012. Disponível em: <https://abir.org.br/o-setor/dados/nec-tares/> Acesso em: 14 out. 2017.
- CAMPOS, RCAB. **Suco de abacaxi com juçara fermentado com *Lactobacillus rhamnosus* GG: resistência da estirpe probiótica às condições gastrointestinais simuladas in vitro e efeito protetor no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas em ratos wistar**. 2016. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais – Campus Rio Pomba, Rio Pomba, 2016.
- FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO)/ WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 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.
- FERREIRA, KA; ALCÂNTARA, RLC. Approaches for implementation of the postponement strategy: a multicase study in the food industry. **Gestão & Produção**, São Carlos, v.20, n.2, p.357-372, 2013.
- FURTADO, LL. **Viabilidade de bactérias probióticas em suco tropical de manga e sobrevivência das estirpes às condições gastrointestinais simuladas in vitro**. 2017. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais – Campus Rio Pomba, Rio Pomba, 2017.
- MAMEDE, MEO et al. Avaliação sensorial e química de suco de laranja. **Alimentos e Nutrição**, v.21, n.2, p.311-324, 2013.
- MARTINS, EMF et al. Minimally processed fruit salad enriched with *Lactobacillus acidophilus*: Viability of anti-browning compounds in the preservation of color. **African Journal of Biotechnology**, v.14, n.24, p.2022-2027, 2015.
- MOREIRA, RM et al. Development of a juçara and Ubá mango juice mixture with added *Lactobacillus rhamnosus* GG processed by high pressure. **LWT-Food Science and Technology**, v.77, p.259-268, 2017.
- OLIVEIRA, DC et al. Blanching effect on the bioactive compounds and on the viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG before and after in vitro simulation of the digestive system in jabuticaba juice. **Semina: Ciências Agrárias**, v.38, n.3, p.1277-1294, 2017.
- PERRICONE, M et al. Viability of *Lactobacillus reuteri* in fruit juices. **Journal of functional foods**, v.10, p.421-426, 2014.
- PIRES, BA. **Viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* GG em bebida mista probiótica de abacaxi com juçara e sobrevivência desta bactéria ao trato gastrointestinal humano**. 2015. 48f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais – Campus Rio Pomba, Rio Pomba, 2016.
- PRATES, FC. **Desenvolvimento de suco misto de juçara e manga adicionado de *Lactobacillus rhamnosus* GG submetido ao estresse ácido e bórico subletal**. 2017. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais – Campus Rio Pomba, Rio Pomba, 2017.
- REALE, A et al. Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastrointestinal tract. **LWT – Food Science and Technology**, v.60, p.721-728, 2015.
- SAAD, SMI. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Rev Bras de Ciênc Farmacêuticas**, v.42, p.1-16, 2006.

Acesse:

www.higienealimentar.com.br
e obtenha informações preciosas
sobre os alimentos



www.facebook.com/revistahigienealimentar