



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

Influência da Quitosana sobre a Viabilidade Celular do Probiótico *Lactobacillus acidophilus* LA 3

Marina Felix Cedran¹, Fábio Júnior Rodrigues², Aline Queiroz da Boa Morte¹, Elke Shigematsu³, Claudia Dorta¹

¹Faculdade de Tecnologia "Estudante Rafael Almeida Camarinha" – Depto. Tecnologia em Alimentos. Av. Castro Alves, 62, 2º Andar – CEP 17506-000 Marília – SP - E-mail: marinafcedran@hotmail.com

²Universidade Estadual de Londrina – Depto. Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Cx. Postal 10.011. Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 Km 380 – CEP 86.057-970 Londrina – PR

³Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Depto. Engenharia e Ciência de Alimentos. R. Cristóvão Colombo, 2265 – CEP 15054-000 São José do Rio Preto – SP

RESUMO

*Esse trabalho teve como objetivo avaliar "in vitro" a influência da quitosana sobre a viabilidade celular de **Lactobacillus acidophilus** LA 3 Sacco[®], visando a possível aplicação deste probiótico em revestimentos comestíveis. Em tubos de ensaio foram inoculados 6,25 Log UFC do probiótico/ml de meio de cultura caldo MRS com e sem adição de quitosana (7500 ppm). Esses tubos de ensaio foram mantidos à 37°C por 24 horas, e para simular estoque refrigerado, à 8-10°C por 48 horas, e 8-10°C por 14 dias. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e de maneira asséptica. Houve diminuição da viabilidade celular dos lactobacilos em função da quitosana e tempo de armazenamento, culminando em -3,1 Log UFC.ml⁻¹ em relação ao inóculo inicial. Para a utilização do polímero à base de quitosana em filmes comestíveis com potencial probiótico seria necessária à adição da cultura em quantidades superestimadas.*

Palavras-chave: Polissacarídeo, Atividade antimicrobiana, Probiótico, *Lactobacillus acidophilus*.

INTRODUÇÃO

A quitosana é um polissacarídeo composto por unidades de 2-acetamida-2-deoxi-D-glicopiranosose e de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose obtida pela desacetilação parcial da quitina (UGALDE, 2014), é encontrado em animais invertebrados e na parede celular de fungos (ALBUQUERQUE et al., 2009).

A utilização de quitosana tem sido amplamente difundida, principalmente em engenharia e biotecnologia de alimentos, visto que este polímero natural é atóxico (ALBUQUERQUE et al., 2009) e suas propriedades conferem aplicabilidade para uso como agente antimicrobiano, formação de revestimentos biodegradáveis ou comestíveis (UGALDE, 2014), e a microencapsulação de probióticos (MENEZES et al., 2013).

Como agente antimicrobiano o mecanismo de ação da quitosana não está completamente elucidado, porém várias propostas são sugeridas. Yadav e Bishe (2004) propõem que a atividade antimicrobiana da quitosana está correlacionada com a formação de complexos polieletrólíticos onde seus grupos protonados se ligam seletivamente a superfície negativamente carregada dos micro-organismos, interferindo na atividade celular e na permeabilidade da membrana, acarretando na perda de componentes intracelulares. No entanto há um grupo de pesquisadores que pressupõem que a atividade antimicrobiana da quitosana está relacionada às



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

propriedades físico-químicas das soluções, a concentração utilizada, o tempo de exposição e as características da membrana do micro-organismo exposto (HARISH PRASHANT; THARANATHAN, 2007; COSTA SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

Em contrapartida este polímero quando se caracteriza por baixa massa molecular, é evidenciado por exercer efeito seletivo benéfico sobre o crescimento e manutenção da viabilidade de bactérias probióticas, como as do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (BARRETEAU; DELATTRE; MICHUD 2006). Tsai e Hwang (2004) observaram a atividade antibacteriana da quitosana *in vitro* analisando algumas bactérias patogênicas de alimentos e bactérias probióticas, verificando que a resistência das espécies probióticas foi superior.

Devido à capacidade de formação de película, a quitosana é utilizada como revestimento comestível em frutas, hortaliças, carnes, e queijos, com intuito de prolongar o shelf-life destes alimentos (LUVIELMO; LAMAS, 2013).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da quitosana sobre a viabilidade celular de um inóculo do probiótico *Lactobacillus acidophilus* LA 3 Sacco® em condições ideais de crescimento e sob refrigeração, para possibilidade de aplicação deste polímero no desenvolvimento de revestimentos comestíveis com potencial probiótico.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado com *Lactobacillus acidophilus* LA 3 Sacco® previamente reativado por três transferências sucessivas em MRS Caldo (Difco BD) com adição de L-cisteína (0,05%), incubados a 37°C por até 48 horas, em atmosfera normal.

Baseando-se em experimentos de Tsai e Hwang (2004), com modificações, foram preparados tubos de reação contendo 7,9 mL de meio MRS caldo (Difco BD) com adição de L-cisteína (0,05%) (Controle), e tubos com 7,9 mL de meio MRS caldo, L-cisteína (0,05%) e quitosana (Polymar Indústria e Comércio LTDA) com grau de desacetilação de 87% (7500 ppm) dissolvida com ácido acético (Tratamento). Todos os tubos foram esterilizados em autoclave à 121°C por 15 minutos.

Foi inoculado 0,1 mL da cultura probiótica reativada ($6,25 \text{ Log UFC.ml}^{-1}$) nos tubos de reação "Controle" e "Tratamento".

As amostras foram acondicionadas em duas temperaturas: 37°C, considerada favorável ao crescimento do micro-organismo e 8-10°C simulando estoque de produto refrigerado.

O monitoramento de células viáveis do probiótico foi realizado nos tubos acondicionados à 37°C por 24 horas; à 8-10°C por 48 horas; e à 8-10°C por 14 dias.

A contagem de células viáveis de lactobacilos foi realizada através de diluições seriadas das amostras em solução extrato de levedura 0,1%, L-cisteína 0,05% e essas semeadas em profundidade em meio MRS Agar (Difco BD) com sobrecamada. A incubação foi em BOD (NOVA Instruments, NI 1704) por 48 horas à 37°C. Todas as amostragens foram feitas em triplicata e de maneira asséptica no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Tecnologia de Marília – SP.

A taxa de sobrevivência do probiótico foi calculada através da equação (Eq. 1) descrita por Tsai e Hwang (2004).

$$\% \text{ Sobrevivência} = \frac{\text{Log UFC.ml}^{-1} \text{ Tratamento}}{\text{Log UFC.ml}^{-1} \text{ Controle}} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Os dados obtidos foram submetidos à análise de Teste t-Student, para comparar as médias entre os dois grupos amostrais, através do programa BIOESTAT (BUSSAB; MORETTIN, 2011). Os resultados foram considerados significativos para $p < 0,0001$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos das análises de células viáveis de *L. acidophilus* LA 3 derivados dos tubos de reação, bem como, a taxa de sobrevivência do probiótico no tratamento com quitosana comparado ao controle estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Células viáveis e taxa de sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* LA 3 em função da quitosana 7500 ppm, em diferentes períodos e temperaturas.

Amostra	Período de análise	Viabilidade (log UFC.ml ⁻¹) M ± DP	Taxa de sobrevivência (%)
Controle Tratamento	37°C 24 horas	8,82 ^b ± 0,02	86,05
		7,59 ^a ± 0,02	
Controle Tratamento	8-10°C 48 horas	6,77 ^b ± 0,07	78,43
		5,31 ^a ± 0,03	
Controle Tratamento	8-10°C 14 dias	5,45 ^b ± 0,1 3,14 ^a ± 0,03	57,61

(1) M = Média da triplicata; DP = Desvio Padrão.

(2) Letras diferentes entre os tratamentos indicam que estes diferem estatisticamente entre si (Teste t-Student, $p < 0,0001$).

Fonte: Dados dos autores.

À temperatura de 37°C por 24 horas, as células viáveis da bactéria aumentaram em relação ao inóculo em 2,57 e 1,34 ciclos logarítmicos, respectivamente, para o controle e tratamento. A quitosana 7500 ppm inibiu de forma significativa o crescimento do micro-organismo em 1,23 ciclos logarítmicos quando comparado ao controle.

Tsai e Hwang (2004) em experimentos com incubação de *Lactobacillus acidophilus* JCM 1173 em MRS caldo com adição de solução de quitosana à 1000 ppm obtiveram valor de taxa de sobrevivência de 90 e 96%, utilizando quitosana com grau de desacetilação (DD), respectivamente, de 95% e 50%. No presente trabalho foi obtida a taxa de sobrevivência de 86,05% nas amostras tratadas em condições experimentais semelhantes, devendo-se atentar que a concentração de quitosana foi 7,5 vezes superior, mostrando que maiores concentrações deste polímero acarretaram em menor taxa de sobrevivência do probiótico. Ainda, Tsai e Hwang (2004) verificaram sensibilidades diferentes à quitosana para bactérias da mesma espécie, mas de linhagens diferentes, como o *L. acidophilus* CCRC 14026, após seu tratamento com 500ppm do referido polímero, obteve apenas 0 e 37% de taxa de sobrevivência, respectivamente, para DD 95 e 70.

Quanto às amostras acondicionadas em temperaturas de 8-10°C, nota-se que a viabilidade celular do probiótico foi diminuída em função do tempo de armazenamento. Nas análises realizadas com 48 horas, o tratamento com quitosana diminuiu 1,46 ciclos logarítmicos a viabilidade de *L. acidophilus* LA 3 quando comparado com o controle, representando taxa de sobrevivência de 78,43%. Kasnowski et al. (2011) destacam que bactérias do gênero *Lactobacillus* podem apresentar atividade mesmo em temperaturas de refrigeração, tal fato, justificaria o crescimento do probiótico na amostra "Controle" na temperatura de 8-10°C.



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

Ao final de 14 dias em refrigeração, as células viáveis nas amostras tratadas com o polímero estudado apresentaram redução de 3,1 e 2,31 ciclos logarítmicos, respectivamente, em relação ao inóculo e controle, além da taxa de sobrevivência de 57,61%. É importante ressaltar que a faixa de temperatura de 8-10°C é representativa do acondicionamento de frutas e hortaliças, aplicadas de revestimento comestível ou não, na sua forma inteira ou minimamente processada, como evidenciado por Luvielmo e Lamas (2013). Estes resultados indicam que para a aplicação de revestimento à base de quitosana (7500 ppm) com a adição de *L. acidophilus* LA 3, visando o ramo de hortaliças, o inóculo deste micro-organismo teria que ser superior a 10^{10} UFC.g⁻¹ de cobertura, para que o consumo de 10g desta tivesse potencialidade probiótica (10^8 UFC.10g⁻¹).

CONCLUSÕES

A quitosana diminuiu a viabilidade celular do probiótico *Lactobacillus acidophilus* LA 3, tanto no teste de crescimento, como em temperatura de refrigeração. Uma vez que este polímero é utilizado na formulação de filmes comestíveis, a adição de cultura probiótica deve ser feita em quantidades superestimadas, afim de que ao final do *shelf-life* do produto revestido a quantidade do probiótico atenda os valores estabelecidos em legislação para que o produto seja considerado com potencial probiótico.

Agências de Fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) PROCESSO nº 2014/11514-8.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, R. B.; SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, T. C. M. Perspectiva e potencial aplicação de quitosana como inibidor de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 10, n. 5, p. 260-274, 2009.
- BARRETEAU H.; DELATTRE C.; MICHUD P. Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 323, 2006.
- BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. **Estatística Básica**. 7. ed., Saraiva, Brasil, 2011.
- COSTA SILVA, H. S. R.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.
- HARISH PRASHANTH, K. V.; THARANATHAN, R. N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential - an overview. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 3, p. 117-131, 2007.
- KASNOWSKI, M. C.; CORTEZ, N. M. dos S.; LIMA, B. R. C. da C.; CORTEZ, M. A. S.; FRANCO, R. M. Ação antagonista de *Lactobacillus acidophilus* frente a *Escherichia coli* inoculada em leite fermentado. **Higiene Alimentar**, v. 25, n. 194/195, p. 868-870, 2011.
- LUVIELMO, M. de M.; LAMAS, S. V. Revestimentos comestíveis em frutas. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 8 n. 1, p. 8-15, 2013.
- MENEZES, C. R.; BARIN, J. S.; CHICOSKI, A. J.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; FRIES, L. M.; TERRA, N. N. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Revista Ciência Rural**, v. 43, n.7, p.1309-1316, 2013.
- TSAI, G. J; HWANG, S. P. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria. **Fisheries Science**; v. 70, p. 675–681, 2004.
- UGALDE, M. L. **Biofilmes ativos com incorporação de óleos essenciais**. Tese de Doutorado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2014.
- YADAV, A.V. and BHISE, S.B. Chitosan: a potential biomaterial effective against typhoid. **Current Science**, v. 87, n. 9, p. 1176-1178, 2004.