ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DO LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. CREMORIS LL95

Sabrina Lopes de Oliveira [1]

Dieine Cassiélen Tavares Machado [2]

Jéssica Ferreira Rodrigues [3]

Cristiano Malavolta [4]

Francielli Weber Santos Cibin [5]

Juliana Bernera Ramalho [6]

Resumo:

O estresse oxidativo é causado pelo desequilíbrio entre a produção e a detoxificação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. O consumo de antioxidantes dietéticos pode contribuir para a melhora dos mecanismos endógenos de defesa e reduzir ou reverter danos oxidativos. Estudos recentes revelam o interesse em probióticos com habilidades antioxidantes significativas in vitro e in vivo. Os probióticos são utilizados na prevenção e tratamento de diversas doenças, como imunomoduladores, na regulação da microbiota intestinal e, em animais de produção, como promotores de crescimento. Além disso, os probióticos são uma alternativa aos antibióticos, cujo uso pode deixar resíduos na carne e selecionar cepas patogênicas resistentes. O Lactococcus lactis subsp. cremoris é uma bactéria gram-positiva, fermentadora, esférica, com cadeia de comprimento variável e crescimento entre 12 e 40°C. A utilização desse microrganismo era restrita à produção de alimentos fermentados, como por exemplo, o queijo Cheddar de onde pode ser isolado. Agora está sendo direcionado também para o uso como probiótico, sendo estudado no mundo todo e apresentando uma produção média de 352 artigos por ano entre 2003 e 2011. Considerando as falhas nas defesas antioxidantes dos organismos, a relevância do uso dos probióticos e o fácil acesso a este microrganismo, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antioxidante in vitro do Lactococcus lactis subsp. cremoris LL95, comparando células intactas, mortas por calor e liofilizadas. O Lactococcus lactis subsp. cremoris foi isolado de queijo mozzarella fatiado pertencente ao acervo de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (DCTA-FAEM-UFPel). Os testes realizados foram: ensaio de atividade antioxidante pela captura do radical DPPH, ensaio de atividade antioxidante pela captura do radical ABTS•+ e potencial antioxidante redutor de ferro (FRAP). A análise estatística foi realizada utilizando one-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey quando necessário. A forma liofilizada da bactéria apresentou maior atividade antioxidante em relação às formas morta por calor e intacta. Mais estudos são necessários para avaliar uma possível utilização do L. lactis subsp. cremoris LL95 como probiótico, principalmente em casos de prejuízo dos sistemas antioxidantes dos seres vivos.

Palavras-chave: estresse oxidativo, probióticos, Lactococcus lactis, antioxidante

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DO LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. CREMORIS LL95

[1] Aluno de graduação. sabrinalopes97@gmail.com. Autor principal

[2] Aluno de Graduação. machadodieine@gmail.com. Co-autor

[3] Graduação em Ciências Biológicas. jfrodrigues.bio@gmail.com. Co-autor

[4] Aluno de Graduação. cristianomalavolta@gmail.com. Co-autor

[5] Docente. franciellicibin@unipampa.edu.br. Orientador

[6] Aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. julianabramalho@gmail.com. Co-orientador

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DO *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *CREMORIS* LL95

1 INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo é causado pelo desequílibrio entre a geração e detoxificação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que causam danos a lipídios, proteínas e DNA. Os sistemas antioxidantes próprios dos organismos vivos geralmente não são suficientes para impedir que os mesmos sofram danos oxidativos. Com isso, o consumo de antioxidantes dietéticos pode contribuir para a melhora dos mecanismos endógenos de defesa e, ainda, reduzir ou reverter os danos causados pela produção excessiva de espécies reativas. Dessa forma, a pesquisa de antioxidantes tem recebido muita atenção e estudos recentes revelam o interesse em probióticos, evidenciando diversos benefícios para a saúde (Williams, 2010).

Os probióticos são microrganismos vivos não patogênicos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Estudos revelaram que as bactérias probióticas apresentam habilidades antioxidantes significativas *in vivo* e *in vitro* (Wang et al., 2017).

Na medicina humana, os probióticos já são utilizados na prevenção e tratamento de diversas doenças, na regulação da microbiota intestinal, de distúrbios gastrintestinais e como imunomoduladores (Coppola & Gil Turnes, 2004). Na medicina veterinária, além dessas utilidades, os probióticos também são usados como promotores de crescimento em animais de produção, sendo uma alternativa aos antibióticos, cujo uso pode deixar resíduos na carne e selecionar cepas patogênicas resistentes (Menten, 2002).

O *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* é uma bactéria gram-positiva, com formato esférico, disposta em cadeias de comprimento variável, com crescimento entre 12 e 40°C e fermentadora, metabolizando lactose para o ácido láctico. A utilização desse microrganismo era restrita à produção de alimentos fermentados em todo o mundo principalmente queijos macios, queijos do tipo Cheddar e muitos leites fermentados, de onde pode ser isolado, assim como da pele de bovinos. Agora, está sendo direcionado a outros usos, como probióticos ou no desenvolvimento de novas vacinas. Essa bactéria ainda é estudada em laboratórios no mundo todo. Por exemplo, entre 2003 e 2011, foram produzidos 294–411 artigos por ano (Demarigny, 2014).

Considerando que os sistemas antioxidantes próprios do organismo não são capazes de proteger completamente humanos e animais do estresse oxidativo, os benefícios já relatados na literatura sobre o uso dos probióticos e o fácil acesso à essa espécie de bactéria, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LL95, comparando células intactas, mortas por calor e liofilizadas.

2 METODOLOGIA

2.1 Microrganismos e condições de crescimento

L. lactis subsp. *cremoris* LL95 isolado de queijo mozzarella fatiado vendido em mercados e minimercados na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul (RS), pertencente ao acervo de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (DCTA-FAEM-UFPel).

Os isolados foram reativados em caldo Man, Rogosa e Sharpe (caldo MRS) (Merk®) a 37ºC por 24h. Alíquotas de 1 mL das culturas foram adicionadas com 20% de glicerol (Synth®) (v/v) e mantidas a -80°C até o momento do uso (cultura de estoque). Dos estoques congelados, as bactérias foram suspensas em caldo MRS, plaqueadas em agar MRS,

cultivadas anaerobicamente a 37°C por 24h, então inoculadas em caldo MRS fresco e cultivadas a 37°C sob condições aeróbias por 24h em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio MRS.

2.2 Preparação de células intactas, células mortas pelo calor e liofilizadas

Os LL95 foram incubados em caldo MRS a 37°C durante a noite e as células intactas foram recolhidas por centrifugação (10000*g*, 10 min) a 4°C. Os sedimentos resultantes foram lavados duas vezes com PBS estéril e ressuspendidos com água destilada estéril a uma concentração final de 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) em 25, 100 ou 1000µL, de acordo com o teste a ser realizado. As células mortas pelo calor foram obtidas por imersão em banho-maria a 95°C por 30 min (Lim et al., 2009). Para a obtenção das células liofilizadas, as amostras foram desidratadas por liofilização (Liotop, Model - L101, Brasil) durante 24 h.

2.3 Ensaio de atividade antioxidante pela captura do radical DPPH

A atividade antioxidante ou sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) do *L. lactis* subsp. *cremoris* foi determinada de acordo com o método de (Xing et al., 2015). O método baseia-se na transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar, o DPPH que possui cor púrpura é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorbância.

Um 1 mL de LL95 e 1 mL de solução de DPPH (0,2 mM) foram misturados. A mistura foi vigorosamente agitada e deixada reagir durante 30 min no escuro a temperatura ambiente. A amostra controle continha água destilada estéril no lugar da amostra. A eliminação do radical DPPH foi monitorada determinando a absorbância a 517 nm. A atividade sequestradora de radicais foi quantificada como unidades/mL (U / mL) usando a seguinte fórmula:

Atividade de eliminação de radicais DPPH (U/mL) = ABS_C - ABS_S/S x 100, onde ABS_C e ABS_S são a absorbância do controle e da amostra a 517 nm, respectivamente, e S é o volume (mL) da amostra.

2.4 Ensaio de atividade antioxidante pela captura do radical $ABTS^{\bullet+}$

A captura do radical 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina ($ABTS^{\bullet+}$) foi medida de acordo com o método de Qi Han et al. (2017). Este radical reage potencialmente com compostos doadores de hidrogênio, sendo convertido em uma forma não colorida, com consequente desaparecimento da absorbância. O $ABTS^+$ foi diluído em 20 mM de tampão de acetato de sódio (pH 4,5) até a absorbância final de 0,70 ± 0,01 a 734 nm. Em seguida, 100 µL de amostra LL95 e 3 mL de solução $ABTS^{\bullet+}$ foram misturados e incubados por 6 min no escuro à temperatura ambiente. A absorbância da mistura foi medida a 734 nm e calculada da seguinte forma:

Taxa de eliminação $ABTS^{\bullet+}$(%) = (Ac - As)/Ac x 100%,onde As é a absorbância da amostra LL95, Ac é a absorbância do controle (solução $ABTS^{\bullet+}$ sem amostra LL95).

2.5 Potencial Antioxidante Redutor de Ferro (FRAP)

O ensaio antioxidante de determinação do poder de redução do íon ferro FRAP (do inglês Ferric Reducing Antioxidant Power) está baseado na produção do íon Fe^{2+} (forma ferrosa) a partir da redução do íon Fe^{3+} (forma férrica) presente no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ). Quando a redução ocorre, há uma alteração na tonalidade da mistura de reação, passando de roxo claro a um roxo intenso, cuja absorbância pode ser medida no comprimento de onda de 595 nm, de acordo com Qi Han et al. (2017), com pequenas modificações. A reagente de trabalho FRAP foi preparado no dia do teste, por adição de 25 mL de tampão acetato à 2,5 mL de cloreto férrico hexa-hidratado 20 mM e 2,5 mL de TPTZ

10 mM. Uma quantidade de 750µL de solução de FRAP foi mantida em banho de água a 37°C. Depois, adicionou-se 25 µL de amostra e 75 µL de água destilada estéril. A mistura foi colocada no escuro por 5 min. E a absorbância foi medida a 593 nm. A curva padrão de $FeSO_4$ foi preparada com 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mM de $FeSO_4 7H_2O$. De acordo com a curva padrão, os valores de FRAP das amostras foram calculados e expressos como a quantidade equivalente de $FeSO_4$ (mM).

2.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando *one-way* ANOVA seguido pelo teste de *Tukey* quando necessário. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados são expressos como média ± S.E.M.

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Tabela 1 – Atividade antioxidante *in vitro* do *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LL95 nos ensaios DPPH, $ABTS^{\bullet+}$ e FRAP.

	DPPH (U/mL)	$ABTS^{\bullet+}$ (%)	FRAP (mM)
Células intactas	1,30±0,50[a]	56,50±4,68[a]	22,40±0,39[a]
Células mortas pelo calor	6,85±0,45[a,b]	32,34±0,22[b]	13,49±0,49[b]
Células liofilizadas	9,40±1,90[b]	79,07±4,73[a]	45,04±0,04[c]

DPPH [os resultados são expressos como atividade eliminadora de radicais DPPH (U/mL)], $ABTS^{\bullet+}$ [os resultados são expressos como $ABTS^{\bullet+}$ taxa de eliminação (%)], FRAP [os resultados são expressos como quantidade equivalente de $FeSO_4$ (mM)]. Os valores apresentados são as médias de três determinações ± S.E.M. Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

O ensaio de DPPH quantifica a capacidade da amostra em sequestrar esse radical livre, onde as células liofilizadas mostraram maior atividade neutralizadora de radicais DPPH, seguidas das células mortas pelo calor e células intactas.

O teste de $ABTS^{\bullet+}$ determina a taxa de eliminação desse radical livre. Não houve diferença na taxa de eliminação do radical entre as células intactas e as células liofilizadas e estas apresentaram taxa de eliminação maior quando comparadas às células mortas pelo calor.

O ensaio de FRAP indica a capacidade antioxidante total da amostra. As células liofilizadas demonstraram a maior capacidade antioxidante total, seguidas das células intactas e por último as células mortas pelo calor.

As células liofilizadas apresentaram a maior atividade neutralizadora de radicais DPPH, a maior taxa de eliminação do radical $ABTS^{\bullet+}$ e a maior capacidade antioxidante total. Isso pode ser explicado pelos diferentes processos aplicados nas amostras de células bacterianas.

Quando morta pelo calor a bactéria passa por um processo de desintegração até a morte celular, o que pode causar perda de mecanismos antioxidantes. Já nas amostras de células intactas, por ser uma bactéria fermentadora, depois de determinado tempo os subprodutos da fermentação tendem a matar as próprias células bacterianas. O processo de liofilização evita essa morte por ser um método bacteriostático, ou seja, inibe a atividade bacteriana, interrompendo o processo fermentativo e mantendo a integridade da bactéria (Sola et al., 2012).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando as avaliações realizadas com o *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LL95, a forma liofilizada da bactéria apresentou maior atividade antioxidante em relação às formas morta por calor e intacta. Mais estudos são necessários para avaliar uma possível utilização do *L. lactis* subsp. *cremoris* LL95 como probiótico na medicina humana e veterinária, principalmente em casos de prejuízo dos sistemas antioxidantes dos seres vivos.

REFERÊNCIAS

COPPOLA, Mario de Menezes; TURNES, Carlos Gil. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n.4, p. 1297-1303, jul./ago. 2004.

DEMARIGNY, Y.LACTOCOCCUS: *Lactococcus lactis* subespécie *lactis* e *cremoris*. **Enciclopédia de Microbiologia de Alimentos**, EUA, v. 2, p. 442-446, 2014.

HAN, Qi et al. In vitro comparison of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Harbin dry sausages and selected probiotics. **Journal of Functional Foods**, China, v. 32, p. 391-400, mar. 2017.

LIM, L.H et al. The effects of heat-killed wild-type Lactobacillus casei Shirota on allergic immune responses in an allergy mouse model. **International archives of allergy and immunology**, China, v. 148, n. 4, p. 297-304, nov. 2008.

MENTEN, J.F.M. Probióticos e aditivos fitogênicos na nutrição de aves. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA NUTRIÇÃO ANIMAL, 2002, Uberlândia, Minas Gerais. **Anais de Scientia Agraria Paranaensis**. Uberlândia: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2002, p.252.

SOLA, Marília Cristina et al. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n. 14, p. 1398-1418, jun. 2012.

XING, J. et al.Determining Antioxidant Activities of Lactobacilli Cell-Free Supernatants by Cellular Antioxidant Assay: A Comparison with Traditional Methods. **PLoS One**, China, v. 10, n. 3, p. 1-16, mar. 2015.

WANG, Y. et al. Antioxidant Properties of Probiotic Bacteria. **Nutrients**, China, v. 9, n. 5, p. 1-15, mai. 2017.

WILLIAMS, N.T. Probiotics. **Am. J. Health Syst. Pharm**. v. 67, n. 6, p. 449–458, mar. 2010.