

## RESISTÊNCIA DA LEVEDURA *Pichia pastoris* AO ARMAZENAMENTO EM SOLUÇÃO SOB REFRIGERAÇÃO E AO TRATO GASTROINTESTINAL DE CAMUNDONGOS

FRANÇA, Rodrigo Correa<sup>1,2</sup>; HAUBERT, Louise<sup>2</sup>; Sabadin, Gabriela<sup>1</sup>;  
 CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo<sup>1</sup>; SILVA, Wladimir Padilha da<sup>2</sup>;

MOREIRA, Ângela Nunes<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia – CDTEC/UFPEL; <sup>2</sup>Lab. Microbiologia de Alimentos, DCTA/FAEM – UFPEL;

<sup>3</sup>Faculdade de Nutrição – UFPEL

Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900, [gabrielasabadin@hotmail.com](mailto:gabrielasabadin@hotmail.com)

### 1 INTRODUÇÃO

Diante de inúmeras doenças relacionadas aos processos digestivos e infecções gastrointestinais que acometem seres humanos e animais, aliado ao crescimento exponencial dos custos médico-hospitalares, é necessário o desenvolvimento de novos conhecimentos científicos e de novas tecnologias capazes de amenizar o impacto causado por essas doenças. Nesse contexto, os alimentos funcionais e especialmente os probióticos são conceitos novos e estimulantes, considerando que ocupam grande espaço entre os alimentos funcionais, representando 65% do total comercializado mundialmente (ROBERFROID, 2002).

Probióticos podem ser definidos como sendo micro-organismos vivos que ao serem administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Para que um probiótico entre no mercado de alimentos funcionais, ele deve atender algumas exigências como: estar em concentrações adequadas para estimular a microbiota intestinal e assim conferir benefícios ao hospedeiro; resistir ao trato gastrointestinal; e resistir às condições em que será armazenado (SANDERS, 2003).

Os probióticos incluem espécies ácido-láticas dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *SporoLactobacillus* e *Streptococcus*; espécies não ácido-láticas, tais como, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Propionibacterium freudenreichii*; e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii* (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002).

A levedura *Pichia pastoris*, pertencente à família Saccharomycetaceae, possui diversas propriedades que a tornam atrativa como um potencial agente probiótico, como a capacidade de produção de grande quantidade de células por litro. Além disso, *P. pastoris* é capaz de utilizar fontes de carbono alternativas, tal como o glicerol resultante da fabricação de biodiesel, podendo então auxiliar na redução deste resíduo industrial. E, por ser utilizada como sistema de expressão de proteínas recombinantes em grande escala, sua utilização como probiótico recombinante está sendo estudada no Centro de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTEC/UFPEL), visto que é uma levedura de fácil manipulação genética, possibilitando a expressão de proteínas terapêuticas ou imunogênicas. Estudos iniciais demonstraram que a levedura é capaz de sobreviver a condições gastrointestinais (GI) simuladas e à passagem através do trato GI de

camundongos (dados não publicados). Além disso, foi observado um potencial efeito antimicrobiano contra *S. Typhimurium* e *E. coli in vitro* (França *et al.* 2009).

A grande maioria dos produtos contendo probióticos disponíveis comercialmente são encontrados na forma líquida e são armazenados sob refrigeração. Por isso, este trabalho teve como objetivos avaliar a resistência da levedura *Pichia pastoris* ao armazenamento em solução sob refrigeração, e a sua resistência ao trato gastrointestinal de mamíferos após 70 dias de armazenamento, utilizando camundongos como modelo animal.

## 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

### 2.1 Microrganismos e condições de cultivo

Para utilização nos experimentos, colônias de *P. pastoris* cepa X-33 isoladas em Ágar Yeast Peptone Dextrose (YPD) foram cultivadas *overnight* em 10 mL de caldo Yeast Peptone Dextrose (YPD) em balão aletado, a 28°C, em agitador orbital (150 rpm). Cinco mililitros desta solução foi adicionada a 45 mL de caldo YPD e a solução foi incubada em agitador orbital a 150 rpm a uma temperatura de 28°C por 12 horas. Após, 20 mL dessa solução foi adicionada a 180 mL de caldo YPD, incubada nas mesmas condições por 12 horas, dividida em 2 frações e centrifugada a 3000 rpm por 10 min. Um pellet foi ressuspenso em 50 mL de solução salina 0,9% e o outro em 50 ml de solução salina tamponada fosfatada (PBS), pH 7,2 . Por fim, os tubos foram armazenados em câmara fria sob uma temperatura de 4°C por até 70 dias.

### 2.2 Avaliação da viabilidade de *Pichia pastoris* armazenada em solução sob refrigeração

Para aferir a resistência da levedura em solução sob refrigeração, 50 µl das duas soluções foram plaqueadas em placas de Petri contendo Ágar Yeast Peptone Dextrose (YPD), utilizando a técnica de *espalhamento* com alça de Drigalski. Após a confirmação da viabilidade, foram feitas diluições em série decimal e contagens em duplicata, a cada 48 horas durante os primeiros 30 dias, e a cada 7 dias após o trigésimo dia. As placas foram incubadas a 30° C por 48 h.

### 2.3 Avaliação da resistência ao trato gastrointestinal de camundongos após 70 dias de armazenamento em solução sob refrigeração

Camundongos BALB/c machos de 6 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da UFPel, alimentados com ração sem antimicrobianos e tratados de acordo com as normas internacionais e em consonância com os princípios éticos de experimentação animal do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), foram inoculados por gavagem com uma única dose da levedura suspensa nas soluções armazenadas sob refrigeração por 70 dias. Um grupo composto de 2 animais recebeu 0,3 mL da solução salina contendo  $2,3 \times 10^9$  UFC/mL da levedura armazenada sob refrigeração e outro recebeu 0,3 mL da solução contendo  $5,3 \times 10^9$  UFC/ mL da levedura suspensa em PBS.

## 2.4 Cálculo das taxas de sobrevivência

As taxas de sobrevivência foram calculadas como as porcentagens do log do número de UFCs que cresceram nas placas após a exposição à armazenagem em solução sob refrigeração e ao trato gastrointestinal de camundongos após 70 dias de estocagem em relação às contagens inicial e da solução administrada por gavagem, respectivamente.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A capacidade da levedura *P. pastoris* de resistir ao armazenamento em solução sob refrigeração e à passagem através do trato gastrointestinal de camundongos após 70 dias de estocagem foi avaliada através de contagens em placa e do cálculo das taxas de sobrevivência (Tabela 1). As contagens de *P. pastoris* se mantiveram estáveis durante todo o período de armazenamento (dados não apresentados), apresentando uma taxa de sobrevivência de praticamente 100% após 70 dias de refrigeração em ambas as soluções (Tab. 1). Esses resultados sugerem que a levedura apresenta uma elevada resistência ao armazenamento em solução sob refrigeração.

Em relação a resistência de *P. pastoris* à passagem através do trato GI de camundongos após 70 dias de armazenamento, foi observado que *P. pastoris* apresentou elevadas taxas de sobrevivência (Tab. 1). Estas taxas foram semelhantes às observadas utilizando inóculos frescos (88,3%) (dados não publicados). Foi observado também que a resistência de *P. pastoris* quando suspensa em PBS foi maior do que quando suspensa em solução salina. Esses resultados sugerem que a levedura apresenta uma elevada resistência ao trato gastrointestinal de camundongos, mesmo após 70 dias de armazenamento e que essa resistência pode ser afetada pelo solvente utilizado.

**Tabela 1.** Taxas de sobrevivência de *P. pastoris* em solução sob refrigeração e ao trato GI de camundongos após 70 dias de armazenamento.

	Taxas de sobrevivência (%)	
	Armazenamento (70 dias) em solução sob refrigeração	Trato GI de camundongos após 70 dias de armazenamento
Solução salina	99	75,8
PBS	100	84,4

Nos últimos anos, o interesse, em nível mundial, sobre a utilização de alimentos funcionais contendo micro-organismos probióticos para a promoção da saúde e prevenção de doenças tem aumentado significativamente. Estudos iniciais com *P. pastoris* demonstraram um efeito probiótico dessa levedura, caracterizado por melhora nos índices de eficiência alimentar e imunomodulação, gerando maior ganho de peso e soroconversão nos animais suplementados (Storch *et al.*, 2008). Esses resultados sugerem que *P. pastoris* apresenta potencial para ser usada como suplemento em alimentação animal.

#### 4 CONCLUSÕES

A levedura *Pichia pastoris* apresentou uma elevada resistência ao armazenamento em solução sob refrigeração, visto que se manteve viável por setenta dias e resistiu à passagem através do trato gastrointestinal em camundongos. Outros experimentos visando avaliar potenciais efeitos probióticos de *Pichia pastoris*, como o desafio *in vivo* frente a enteropatógenos, bem como experimentos de imunomodulação, serão realizados.

#### 5 REFERÊNCIAS

FRANÇA *et al.* Avaliação IN VITRO do potencial probiótico antimicrobiano *Pichia pastoris*. In: 25º. **CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, Porto de Galinhas, 12/11/09. 25º. Congresso Brasileiro de Microbiologia.

HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v.35, n.2/3, p.109-116, 2002.

ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Dig. Liver Dis.**, Rome, v.34, suppl.2, p.S105-S110, 2002.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutr. Rev.**, New York, v.61, n.3, p.91-99, 2003.

STORCH, Otávio Brod. **Avaliação de *Pichia pastoris* e *Pichia pastoris* recombinante contendo o gene da fosfolipase C de *Clostridium perfringens* como probióticos para frangos de corte. 2008**, Dissertação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 17/11/08.