

Avaliação do efeito prebiótico de cacau em pó sobre o crescimento *in vitro* de cepas de *Lactobacillus*

Renato da Silva Teixeira¹; 0000-0002-7558-4958
Fábio de Souza Ferreira¹; 0000-0002-7819-1164
Camilly Nunes Muniz¹; 0009-0000-3549-0343
Alexandre Oliveira da Silva¹; 0009-0008-6309-8291
Carlos Alberto Sanches Pereira¹; 0000-0002-6227-6198

1 – UniFOA, Centro Universitário de Volta Redonda, Volta Redonda, RJ.
renato.teixeira@foa.org.br (contato principal)

Resumo: A crescente preocupação dos consumidores com uma alimentação saudável destaca o aumento da procura por alimentos funcionais, como os probióticos e prebióticos. Os probióticos são alimentos compostos de micro-organismos vivos que, quando ingeridos regularmente em doses adequadas, trazem benefícios à saúde. Já os prebióticos atuam como substratos seletivos para esses micro-organismos, favorecendo o crescimento da microbiota, quando combinados, formam os simbióticos. O cacau e seus derivados, além de serem amplamente consumidos devido ao sabor, são reconhecidos por seus benefícios à saúde, como a redução de riscos cardiovasculares e distúrbios metabólicos. Pesquisas recentes mostram que os polifenóis presentes no cacau interagem com a microbiota gastrointestinal, modulando a diversidade microbiana e promovendo o crescimento de bactérias benéficas, enquanto inibem as patogênicas, exercendo um efeito prebiótico. O objetivo do estudo é avaliar o efeito prebiótico do cacau em pó sobre o crescimento *in vitro* de diferentes cepas de *Lactobacillus*. Para tanto, o cacau em pó e as cepas foram adquiridos comercialmente. O experimento foi realizado em microplacas contendo caldo MRS acrescido de cacau em pó em um gradiente de concentração, incubadas a 37 °C por 24 horas, com leituras de absorbância em DO 625nm, nos intervalos de 0 e 24 horas. Os resultados foram comparados ao controle (sem cacau) e analisados estatisticamente utilizando o teste ANOVA, considerando significativos os valores de *p* inferiores a 0,05. No presente estudo foi observado um maior crescimento dos *Lactobacillus* nos meios MRS acrescido de 0,5% de cacau, indicando que a taxa de crescimento ótima ocorre próxima à esta concentração. Por outro lado, na concentração de 2% cacau as espécies de *Lactobacillus* obtiveram o pior resultado dentre as concentrações testadas, possivelmente pelo cacau em pó ter proporcionado o aumento do pH do meio de cultura.

Palavras-chave: Prebióticos. Probióticos. *Lactobacillus*. Cacau. Alimento funcional

INTRODUÇÃO

Observa-se a cada ano, uma crescente preocupação com uma alimentação mais saudável, os consumidores vêm aumentando a preferência por alimentos ricos em componentes que além de nutrir também promovem a saúde, os chamados alimentos funcionais.

Dentre esses alimentos destacam-se os probióticos e os prebióticos. Se por um lado os probióticos são definidos como alimentos compostos de micro-organismos vivos, que quando ingeridos em doses adequadas e com frequência, trazem diversos efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (Kerry et al., 2018), por outro os prebióticos são alimentos que contém substratos fermentados seletivamente por estes microrganismos que compõem a microbiota (Davari et al., 2019). Desta forma, quando associados eles compõem os simbióticos.

O cacau e seus derivados são abundantemente consumidos em todo o mundo devido ao seu sabor agradável e aos inúmeros benefícios a saúde, com a diminuição do risco de doenças cardiovasculares e distúrbios metabólicos (Andújar et al., 2012).

Recentemente, a comunidade científica começou a estudar os mecanismos de ação do cacau, considerando a interação entre os polifenóis do cacau e a microbiota gastrointestinal, e os subsequentes resultados para a saúde. Os polifenóis dietéticos podem interagir com a microbiota intestinal e promover ou inibir seletivamente o crescimento e a proliferação microbiana (Sorrenti et al., 2020). Da mesma forma, os polifenóis do cacau parecem modular a diversidade microbiana, promovendo a proliferação de algumas bactérias e inibindo as potencialmente patogênicas, exercendo mecanismos prebióticos. Decifrar essa interação nos permite compreender o mecanismo de ação dos polifenóis do cacau e personalizar suas dosagens e tipos para a saúde humana.

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito prebiótico de cacau em pó sobre o crescimento *in vitro* de diferentes cepas de *Lactobacillus*.

MÉTODOS

O cacau em pó foi obtido comercialmente, bem como, as cepas de *Lactobacillus* que foram adquiridos em farmácias de manipulação da cidade de Volta Redonda-RJ. Para a utilização nos ensaios, cada cepa foi inicialmente cultivada em caldo MRS a 37 °C durante 24 horas, posteriormente foram colhidas as células por centrifugação (4500 g, 15 min, 4 °C) e ressuspensas em salina estéril para obtenção de aproximadamente 6 log UFC/mL, verificada por meio de plaqueamento pour plate em ágar MRS (Teixeira, 2011).

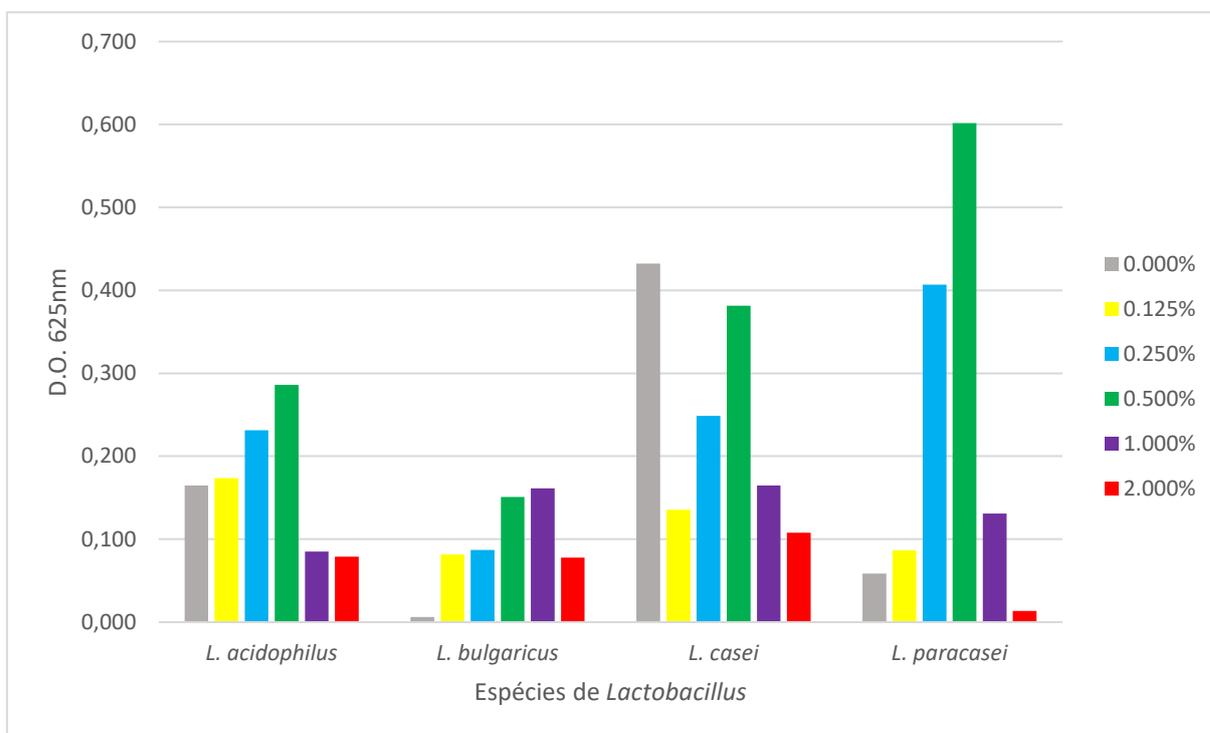
Para avaliação do efeito prebiótico do cacau em pó foi utilizada a metodologia proposta por Sánchez-Zapata et al. (2013) modificada, onde 10 µL da suspensão celular das cepas de *Lactobacillus* foram inoculadas em microplacas de 96 poços contendo 200 µL de caldo MRS acrescido de cacau em pó em um gradiente de concentração, 0,125%; 0,25%; 0,5%; 1% e 2%. Logo após, a microplaca foi incubada a 37 °C, durante 24 horas. Nos intervalos de tempo 0 e 24 horas, a absorbância dos cultivos foram determinadas pela leitura de DO625 nm (densidade óptica) em espectrofotômetro. Como controle, os microrganismos foram cultivados na mesma condição utilizado o caldo MRS sem acréscimo de cacau. Para o branco da leitura no espectrofotômetro foram utilizados os respectivos caldos sem inoculação. Vale ressaltar que todos os testes foram realizados em quintuplicata.

Em relação a análise estatística, foi utilizado o software Bioestat 5.3, para realização do teste ANOVA seguido do teste de Tukey, com o objetivo de comparação entre as médias das absorbâncias dos meios acrescidos de cacau em pó com o meio controle, considerando a diferença estatisticamente significativas quando os valores de p forem inferiores a 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 4 espécies de microrganismos probióticos, rotulados como sendo das espécies *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei* e *L. paracasei*. Os resultados referentes ao efeito do cacau sobre o crescimento dessas cepas encontram-se apresentados na Figura 1.

Figura 1 – Valores de DO (625 nm) relativos ao crescimento de cepas de *Lactobacillus* em meio MRS contendo diferentes concentrações de cacau.



Fonte: O autor

Observa-se em relação a espécie *L. acidophilus* que a maior média de leitura de DO 0,286 foi obtida na concentração 0,5% de cacau, seguida de 0,232 obtida a 0,25% de cacau. Ambas, quando comparadas com as menores leituras DO de 0,085 e 0,079, encontradas nas concentrações de 1 e 2%, respectivamente, apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Em *L. bulgaricus* foram obtidas as menores médias de DO entre todas as espécies. Quando comparadas as leituras das diferentes concentrações de cacau, aqueles que se diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) foram as de 1,0% e 0,5% em relação ao crescimento do microrganismo em meio MRS sem adição de cacau.

L. casei e *L. paracasei* apresentaram comportamento parecido em relação aos meios contendo cacau, assim como ocorreu com *L. acidophilus* as maiores leituras foram alcançadas nas concentrações de 0,5% e 0,25%. O pior desempenho também ocorreu na concentração de 2% de cacau, as quais foram significativamente menores ($p < 0,05$).

L. casei se diferiu das demais cepas em relação ao seu crescimento no meio puro, onde a leitura de DO (0,432) foi superior aos meios contendo cacau, apesar disso, quando comparada com as leituras nas concentrações de 0,5% e 0,25%, não houve diferença estatisticamente significativa.

De acordo com Dala-Paula et al. (2021) por apresentar altos níveis de compostos, incluindo flavonoides, ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinâmicos, metilxantinas, alcaloides, aminoácidos e aminas bioativas, o cacau é possui um grande potencial de utilização como matéria-prima na produção de alimentos funcionais. Neste sentido, em estudo realizado por Sorrenti et al. (2020) sobre a interação entre cacau e a microbiota gastrointestinal, demonstra que os flavonoides presentes podem ter um papel crucial na promoção do crescimento microbiano, a fim de produzir efeitos subsequentes na saúde.

No presente estudo foi observado um maior crescimento dos *Lactobacillus* nos poços que continham o meio MRS acrescido de 0,5% de cacau, indicando que a taxa de crescimento ótima ocorre próxima à esta concentração.

Por outro lado, na concentração de 2% cacau as espécies de *Lactobacillus* obtiveram o pior resultado dentre as concentrações testadas, possivelmente pelo cacau em pó ter proporcionado o aumento do pH do meio de cultura, uma vez que ele passa pelo processo de alcalinização nas indústrias alimentícias. De acordo com Medeiros; Niro, (2022) a alcalinização traz algumas vantagens, como: maior solubilidade do cacau em água; altera o sabor do produto, diminuindo o amargor e acidez presentes; e por fim, mas não menos importante, alteração da cor do produto, variando de marrom amarelado até preto. Neste tocante, sabe-se que *Lactobacillus* possuem uma faixa de pH ótimo variando entre 5,5 e 6,2, mostrando uma certa afinidade com meios ácidos. Em contrapartida, possuem crescimento reduzido em meios neutros e alcalinos (Teberga, 2017).

CONCLUSÕES

A presente pesquisa demonstrou que o cacau exerce um efeito variável sobre o crescimento de diferentes espécies de *Lactobacillus*. As concentrações de 0,5% e 0,25% de cacau promoveram o maior crescimento das espécies *L. acidophilus*, *L.*

casei e *L. paracasei*, com valores de densidade óptica significativamente superiores às concentrações mais elevadas de cacau (1% e 2%). Esses resultados indicam que a concentração ideal para o crescimento de *Lactobacillus* está próxima a 0,5% de cacau. Em contrapartida, a concentração de 2% resultou nos piores desempenhos para todas as espécies, sugerindo que o processo de alcalinização do cacau pode ter alterado o pH do meio de cultura, desfavorecendo o crescimento bacteriano. Portanto, os resultados indicam que a adição de cacau em concentrações adequadas pode ser uma estratégia promissora na formulação de alimentos funcionais, potencialmente favorecendo a proliferação de probióticos em níveis ótimos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Oswaldo Aranha (FOA) e ao Centro Universitário de Volta Redonda (UniFOA), pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do estudo (92653-PIC/FOA).

REFERÊNCIAS

ANDÚJAR, I. et al. Cocoa Polyphenols and Their Potential Benefits for Human Health. **Oxidative Med. Cell. Longev.** v. 2012, p 1-23, 2012.

DALA-PAULA, B. M. et al. *In vitro* bioaccessibility of amino acids and bioactive amines in 70% cocoa dark chocolate: What you eat and what you get. **Food Chemistry.** n. 343, 2021.

DAVARI, D. D. et al. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. **Foods.** n. 8, v.92, p 1-27, 2019.

KERRY, R.G. et al. Benefaction of probiotics for human health: A review. **J. Food Drug Anal.** v. 26, p. 927–939, 2018.

MEDEIROS, J.; NIRO, C. Pesquisas e atualizações em ciência dos alimentos. Jardim do Seridó, RN: **Agron Food Academy**, 2022.

SÁNCHEZ-ZAPATA, E. et al. In vitro evaluation of “horchata” co-products as carbon source for probiotic bacteria growth. **Food and Bioproducts Processing**. n. 91, p. 279–286, 2013

SORRENTI, V. et al. Cocoa Polyphenols and Gut Microbiota Interplay: Bioavailability, Prebiotic Effect, and Impact on Human Health. **Nutrients**. n. 12, v. 1908, p. 1-16, 2020.

TEBERGA, P. M. F. **Avaliação de diferentes prebióticos sobre o desenvolvimento de cepas de *Lactobacillus***. 2017. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Biotecnologia. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, SP, 2017.

TEIXEIRA, R. S. **Avaliação do efeito de micro-organismos probióticos sobre *Haemonchus contortus* em ovinos**. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) –Departamento de Biotecnologia. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, SP, 2011.