

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

MATHEUS CHAVES DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CRESCIMENTO DE *Lactobacillus rhamnosus*

Brasília -DF
2025

MATHEUS CHAVES DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CRESCIMENTO DE *Lactobacillus rhamnosus*

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia,
da Universidade de Brasília como requisito
parcial para a obtenção do título de bacharel em
Farmácia. Orientadora: Profa. Dra. Pérola de
Oliveira e Magalhães. Coorientadora: Letícia
Santos Abrunhos

Brasília - DF

2025

AGRADECIMENTOS

A Deus e todos os meus guias espirituais, e a tudo que só a minha fé alcançou.

À minha mãe Arleide, que além de todo o apoio emocional, sacrificou muito de seus próprios sonhos e objetivos em nome dos meus. A ela e a todos que vieram antes de mim e não puderam chegar até aqui, sou grato.

Ao meu companheiro Rodrigo, que me acompanhou e me deu suporte integral, durante a elaboração desse trabalho, e me apoia nos meus melhores e piores momentos.

Agradeço também às professoras Dâmaris, Pérola minha orientadora, e Yris. À Letícia, minha coorientadora, às técnicas Patrícia e Julia e a todos que passaram pelo Lapronat com quem eu tive o prazer de conviver e aprender muito, essas pessoas foram fundamentais em diversos momentos da minha jornada durante a graduação.

Resumo

O *Lactobacillus rhamnosus* é uma bactéria ácido-lática amplamente utilizada como probiótico e com aplicações na indústria de alimentos e farmacêutica. Entretanto, seus custos de produção são elevados, envolvendo o uso de meios fermentativos complexos, como o MRS, com rendimento relativamente baixo e a necessidade de processos onerosos de purificação. Diante disso, é necessário o desenvolvimento de estratégias de cultivo que diminuam os custos e aumentem o rendimento. Este estudo avaliou o perfil de crescimento do *L. rhamnosus* em meio MRS. Foram realizados experimentos com diferentes condições de cultivo, avaliando o efeito de diferentes volumes do meio de cultivo, a distribuição tridimensional do meio em diferentes frascos e a adição de peptona e glicose ao meio. Não houve diferenças significativas no perfil de crescimento com relação ao volume e mudanças na distribuição tridimensional do meio nas condições avaliadas, as adições de peptona e glicose demonstraram efeito inibitório estatisticamente significativo. No entanto, mais estudos devem ser realizados para sustentar estes achados.

Abstract

Lactobacillus rhamnosus is a lactic acid bacterium widely used as a probiotic, with applications in food and pharmaceutical industries. However, its production costs are high, involving the use of complex fermentation media such as MRS, relatively low yields, and expensive purification processes. Therefore, it is necessary to develop cultivation strategies that reduce costs and increase yields. This study evaluated the growth profile of *L. rhamnosus* in MRS broth. Experiments were conducted under different cultivation conditions, assessing the effects of varying medium volumes, the three-dimensional distribution of the medium in different flasks, and the addition of peptone and glucose to the medium. No significant differences in growth profile were observed regarding medium volume or its spatial distribution under the tested conditions. However, the addition of peptone and glucose showed a statistically significant inhibitory effect. Further studies are needed to support these findings.

Sumário

1. Introdução	7
2. Objetivos.....	9
2.1 Objetivo geral	9
2.2 Objetivos específicos	9
3. Materiais e métodos.....	9
3.1 Reativação do microrganismo	9
3.2 Preparo de inóculo	9
3.3 Cultivo em meio líquido e avaliação de crescimento em diferentes volumes.....	10
3.4 Avaliação da superfície de contato e distribuição tridimensional	10
3.5 Planejamento experimental delineamento composto central.....	10
3.6 Otimização do meio e avaliação do crescimento.....	12
3.8 Curva de crescimento para <i>L. rhamnosus</i> em meio líquido MRS.....	12
3. Resultados e Discussões	13
4.1 Avaliação de escalonamento	13
4.2 Avaliação da superfície de contato e distribuição tridimensional	14
4.3 Planejamento experimental delineamento composto central.....	14
5. Conclusão	16
Referências	17

1. Introdução

Os lactobacilos representam um grupo extenso de bactérias ácido-láticas, das quais algumas espécies são amplamente utilizadas na indústria para a produção de laticínios fermentados e outros alimentos ou usados como probióticos. São bacilos gram positivos, não formadores de esporos e que produzem ácido láctico como principal produto de fermentação (Ibrahim, 2016). Esses microrganismos, mais conhecidos pela sua aplicação na produção de laticínios e no tratamento de diarreia, apresentam várias outras aplicações, tanto na indústria, quanto em saúde.

Muitas evidências sustentam o uso de probióticos na diarreia tanto de origem infecciosa, quanto induzida por antibióticos, seja atuando como imunomodulador ou regulando a microbiota intestinal, competindo com outras bactérias (Daragh Hill Ivan Sugrue, 2018; Hania Szajewska Maciej Kołodziej, 2019; Shafi et al., 2014). Outros estudos apontam efeitos similares na microbiota bucal, com utilização na prevenção de cáries e auxiliando no tratamento de outras doenças e exercendo efeito protetor contra microrganismos patogênicos com desfechos positivos na utilização de probióticos na prática clínica em odontologia (L. Näse Katja Hatakka, 2001; Silvia D'Agostino Giulia Valentini, 2024). Além dos benefícios já citados, estudos indicam o potencial de algumas espécies como *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus plantarum* no alívio da intolerância à lactose, tratamento da obesidade, auxiliar no tratamento de câncer e até transtornos psiquiátricos (Daragh Hill Ivan Sugrue, 2018; Kerlynn Desrouillères Mathieu Millette, 2016; Shafi et al., 2014)

Com o aumento progressivo de resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis no mercado, o surgimento de cepas multirresistentes e a diminuição do desenvolvimento de novos

antibióticos seguros e eficazes, surgem também diferentes abordagens para obtenção de novas substâncias antimicrobianas. Nesse contexto alguns estudos avaliam os lactobacilos como potencial fonte de novos antimicrobianos, a partir de seus metabólitos como as bacteriocinas. Algumas bacteriocinas extraídas de culturas de *L rhamnosus* LS-28 já foram caracterizadas nos estudos de Lihui Zhang Lu Wang, 2016 e Xing Guo Jiaxin Chen, 2020 e apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro*. Tanto outras cepas de *L rhamnosus* quanto outras espécies de bactérias ácido-láticas podem ser fontes de muitos metabólitos ainda desconhecidos e de interesse farmacêutico, biotecnológico e industrial. A otimização das condições de cultivo é um dos principais desafios para a produção de probióticos e biofármacos, e a formulação do meio é um fator crucial no desenvolvimento do microrganismo, na biomassa final e na composição dos metabólitos gerados. Probióticos comerciais de *L rhamnosus* ainda têm um custo elevado devido a processos fermentativos caros e pouco eficientes. O meio mais utilizado no cultivo de lactobacilos é o de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) que apresenta desvantagens em relação ao custo e processos de purificação dispendiosos (Tao Wang Yingying Lu, 2019). Quanto ao processo de otimização dos meios de cultura, diversas abordagens podem ser adotadas com diferentes objetivos como diminuir os custos ou aumentar o rendimento. Nesse sentido, este estudo busca analisar os efeitos do enriquecimento do meio MRS com glicose e peptona no crescimento de *Lactobacillus rhamnosus* (LR-G14, Lemma) em cultivo estacionário.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da adição de fontes de carbono e nitrogênio em meio MRS no crescimento de *Lactobacillus rhamnosus*

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o crescimento de *L rhamnosus* em meio MRS em frascos com diferentes volumes.

Avaliar a influência da adição de glicose e peptona no crescimento de *L rhamnosus* em meio MRS.

3. Materiais e métodos

3.1 Reativação do microrganismo

A cepa de *L. rhamnosus* (LR-G14, Lemma) foi reativada a partir do estoque armazenado a -80 °C em freezer, por inoculação em placas de Petri contendo meio MRS sólido (Merk) utilizando alça de inoculação estéril. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas, em estufa bacteriológica.

3.2 Preparo de inóculo

Após 48 horas de incubação a 37°C, colônias crescidas no ágar MRS (Merck) foram transferidas para um Falcon de 15 ml contendo 10 ml de água destilada autoclavada, até a obtenção de uma suspensão com aparência leitosa. A absorbância da suspensão foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis shimadzu UV1800 em OD igual a 600 nm para ajuste do inóculo a uma concentração final equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml (correspondente a 0,5 na escala de McFarland) (McFARLAND, 1907)

3.3 Cultivo em meio líquido e avaliação de crescimento em diferentes volumes de meio e frascos de diferentes tamanhos.

O meio líquido MRS foi preparado seguindo as instruções do fabricante, através da dissolução em água destilada na concentração equivalente a 52,2g/l, sob agitação em placa de agitação magnética, seguida de esterilização em autoclave por 15 min a temperatura de 121°C. O inóculo foi cultivado em Erlenmeyer de 125, 250 e 500 ml, contendo 25, 50 e 100 ml de meio respectivamente. Cada Erlenmeyer foi adicionado com a solução do inóculo nos volumes necessários para atingir a concentração inicial de 1×10^8 UFC/ml e incubadas a 37°C por 24 horas, sem agitação. O crescimento foi determinado pela diferença das leituras de absorbância UV iniciais (Abs) e ao final de 24h de cultivo (Absf). Os resultados (tabela 1) foram considerados para definir os volumes de meios dos cultivos subsequentes e otimizar o uso de reagentes.

3.4 Avaliação da superfície de contato e distribuição tridimensional

Para avaliar o efeito da distribuição tridimensional do microrganismo no meio e superfície de contato, foram realizados três cultivos (com o volume fixo de 25 ml de meio) em Erlenmeyers de volumes diferentes: 50 ml (A) 125 ml (B) e 250 ml (C). As demais condições de cultivo foram as mesmas utilizadas no item 3.3.

3.5 Planejamento experimental delineamento composto central

O Delineamento Composto Central (DCC) foi aplicado com a finalidade de avaliar os efeitos da adição de uma fonte extra de carbono e de nitrogênio e definir o planejamento dos experimentos, através do software Protimiza Experimental Design (RODRIGUES; COSTA, 2025). Foram selecionadas as duas variáveis independentes – as concentrações de Glicose (X_1)

e de Peptona (X₂) – para avaliar seus efeitos no crescimento do microrganismo, dispostas na Tabela 1.

Tabela 1: Variáveis independentes e as concentrações utilizadas no planejamento experimental.

Variáveis	Unidades	-1	0	+1
Glicose (X ₁)	%	0	2	4
Peptona (X ₂)	%	0	2	4

Fonte: Elaborado pelo autor no Protimiza Experimental Design (2025).

O número de experimentos foi calculado, portanto, a partir do Delineamento Composto Central, de acordo com a equação descrita a seguir:

$$r \cdot 2^k + cp = 1 \cdot 2^2 + 3 = 7$$

Em que: r = repetições genuínas
k = número de fatores
cp = pontos centrais

A Tabela 2 apresenta a Matriz do Delineamento Experimental.

Tabela 2: Matriz do Delineamento Experimental

	X Codificados		X Reais	
	Glicose (X ¹)	Peptona (X ²)	Glicose (X ¹)	Peptona (X ²)
1	-1	-1	0	0
2	1	-1	4	0
3	-1	1	0	4
4	1	1	4	4
5	0	0	2	2
6	0	0	2	2
7	0	0	2	2

Fonte: Elaborado pelo autor no Protimiza Experimental Design (2025).

3.6 Otimização do meio e avaliação do crescimento

Para avaliar os efeitos da adição de peptona e glicose no crescimento do microrganismo, foram realizados sete cultivos, de acordo com as condições definidas pelo planejamento experimental DCC (Tabela 2). Os resultados foram expressos em variação da absorbância (Δ abs) e UFC/ml. A concentração final de microrganismos foi calculada a partir da escala de Mcfarland como um valor estimado a partir da absorbância em OD 600 nm.

3.8 Curva de crescimento para *L. rhamnosus* em meio líquido MRS.

Durante 24h de cultivo as amostras foram transferidas para tubos cônicos de centrifuga previamente pesados e submetidas a centrifugação a 10.000 x G por 10 min. O sobrenadante foi descartado, e o microrganismo precipitado foi congelado a -80 °C, liofilizado e pesado. O resultado foi expresso pela biomassa final absoluta em gramas, e a curva de crescimento para o cultivo da cepa de *L. rhamnosus* em meio líquidos contendo MRS foi construída. As condições de cultivo foram Erlenmeyer de 125 mL, em estufa de crescimento bacteriológico sem agitação a temperatura de 37°C e inóculo inicial igual a 0,5 na escala de Mcfarland que representa o equivalente a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml (dados não apresentados). A partir desta curva foi possível observar o início da fase estacionária de crescimento do *Lactobacillus rhamnosus* no tempo de 24 horas, o que determinou o tempo de cultivo dos experimentos deste estudo.

3. Resultados e Discussões

4.1 Cultivo em meio líquido e avaliação de crescimento em diferentes volumes de meio e frascos de diferentes tamanhos.

Após o cultivo de 24 horas, não houve diferença significativa no crescimento de *L. rhamnosus* no meio MRS para os cultivos nos diferentes volumes avaliados, sugerindo que o volume livre do frasco não influenciou no crescimento do microrganismo nas condições avaliadas. É importante destacar que apesar da variação de volume utilizada, este estudo ainda manteve a escala de bancada, sendo necessário a realização de estudos de escala piloto para avaliar a influência de um aumento de escala mais expressivo no crescimento do microrganismo. Sabe-se que ao aumentar a escala de um processo fermentativo, pode se perder a condição de reator homogêneo (Schmidell et al., 2001) o que significa, por exemplo, que o crescimento do microrganismo e a transformação do substrato em produtos possa ocorrer em diferentes velocidades em regiões distintas do biorreator, principalmente nas condições de cultivo utilizadas, sem agitação e sem aeração.

Tabela 3: Avaliação do crescimento microbiano pela variação da absorbância do meio em espectrofotômetro UV/Vis em OD 600 após 24 de cultivo de *L. rhamnosus* em meio líquido MRS a 37°C por 24 horas, sem agitação em Erlenmeyer de diferentes tamanhos.

volume	Abs0	Absf	Δ abs
125 ml	0,229	0,578	0,349
250 ml	0,229	0,58	0,351
500 ml	0,205	0,594	0,389

4.2 Avaliação da superfície de contato e distribuição tridimensional

A hipótese inicial avaliada era que, em um cultivo estacionário, a distribuição tridimensional dos microrganismos no meio poderia influenciar o crescimento pela alteração das superfícies de contato, acesso a nutrientes pelas células e trocas gasosas no meio, visto que as células tendem a sedimentar e se concentrarem no fundo. Entretanto não houve variação significativa no crescimento microbiano nas condições avaliadas, o que foi observado pelo delta da absorbância após 24 horas de cultivo (Tabela 3). É importante destacar novamente que estes resultados podem não se reproduzir em maiores escalas.

Tabela 4 : Avaliação do crescimento microbiano pela variação da absorbância do meio em espectrofotômetro UV/Vis em OD 600 após 24 de cultivo de *L. rhamnosus* em meio líquido MRS a 37°C por 24 horas, sem agitação em frascos de diferentes volumes com o mesmo volume de meio.

Volume Recip.	abs inicial	absf	Δ abs
50 ml	0,239	0,5505	0,3115
125 ml	0,24	0,5415	0,3015
250 ml	0,252	0,5705	0,3185

4.3 Planejamento experimental delineamento composto central

Os resultados obtidos por meio do planejamento experimental, utilizando o Delineamento Composto Central (DCC), indicaram que tanto a adição de Glicose (X_1) quanto de Peptona (X_2) ao meio MRS apresentou efeito negativo estatisticamente significativo ($p < 0,05$) sobre o crescimento microbiano (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5: Valores da concentração final calculada de microrganismos baseada na escala de McFarland.

	Valores Codificados		Valores Reais		Respostas
	Glicose (X_1)	Peptona (X_2)	Glicose (X_1)	Peptona (X_2)	UFC/ml calculado
1	-1	-1	0	0	$1,57 \cdot 10^{10}$
2	1	-1	4	0	$1,03 \cdot 10^{10}$
3	-1	1	0	4	$1,34 \cdot 10^{10}$
4	1	1	4	4	$0,7 \cdot 10^{10}$
5	0	0	2	2	$1,26 \cdot 10^{10}$
6	0	0	2	2	$1,29 \cdot 10^{10}$
7	0	0	2	2	$1,23 \cdot 10^{10}$

Fonte: Elaborado pelo autor no Protimiza Experimental Design (2025).

A partir dos resultados experimentais, foi realizada a análise de regressão ao nível de significância de $\alpha = 5\%$ (Tabela 6).

Tabela 6: Resultados da análise de regressão para o cultivo de *L. rhamnosus* com adições de peptona e glicose.

Nome	Coefficiente	Erro padrão	t calculado	p-valor
média	1,2	0,03	40,05	0
x_1	-0,3	0,04	-7,42	0,0051
x_2	-0,14	0,04	-3,52	0,0388
$x_1 \cdot x_2$	-0,03	0,04	-0,63	0,5739

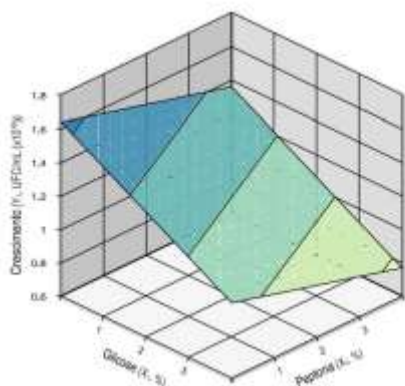
Fonte: Elaborado pelo autor no Protimiza Experimental Design (2025).

Como a interação $x_1 \cdot x_2$ não foi significativa ($p > 0,05$), foi excluída do modelo matemático descrito a seguir ($R^2 = 95,21\%$):

$$Y_1 = 1,20 - 0,30 x_1 - 0,14 x_2$$

A partir do modelo, foram gerados os gráficos de superfície de resposta (Figura 1A) e de contorno (Figura 1B), que evidenciam a diminuição no crescimento microbiano, com o aumento das concentrações de peptona e glicose, sugerindo um efeito inibitório da adição de ambos ao meio MRS sobre o crescimento do *L. rhamnosus*.

A)



B)

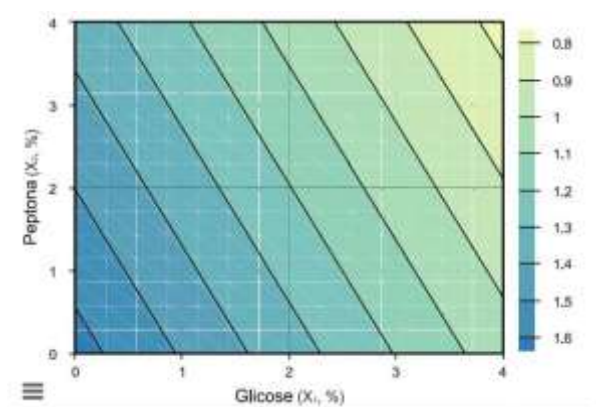


Figura 1: Gráfico de superfícies de resposta (a) e curvas de contorno (b) para cultivo de *L. rhamnosus* em meio MRS nas condições de cultivo propostas no Delineamento Composto Central (DCC).

5. Conclusão

A utilização de peptona e glicose como fontes extras de nitrogênio e carbono no cultivo de *L. rhamnosus* em meio líquido MRS apresentou efeito inibitório significativo no crescimento do microrganismo nas condições definidas pelo Delineamento Composto Central (DCC). Observou-se ainda que as alterações de volume de cultivo e distribuição tridimensional do meio não tiveram efeito no crescimento nas condições testadas neste trabalho. Desta forma, sugerem-se, além dos testes de validação do modelo matemático, a realização de novos estudos de otimização do processo para verificar o efeito de outras variáveis.

Referências

- Daragh Hill Ivan Sugrue, C. T. C. H. C. S. R. P. R. (2018). The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, p.).
- Hania Szajewska Maciej Kołodziej, D. G. A. S. M. R. R. S. (2019). Systematic review with meta-analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG for treating acute gastroenteritis in children – a 2019 update. In *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* (Vol. 49, Issue 11, pp. 1376–1384). <https://doi.org/10.1111/apt.15267>
- Ibrahim, S. A. (2016). Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: Other Species. In *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00857-X>
- Kerlynn Desrouillères Mathieu Millette, M. J. B. M. O. F. M. L. (2016). Cancer preventive effect of a specific probiotic fermented milk components and cell walls extracted from a biomass containing *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R, and *L. rhamnosus* CLR2 on male F344 rats treated with 1,2-dimethylhydrazine. *Journal of Functional Foods*, 26, 373–384. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.005>
- L. Näse Katja Hatakka, E. S. M. S. A. P. T. P. R. K. J. H. M. (2001). Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Research*, 35(6), 412–420. <https://doi.org/10.1159/000047484>
- Lihui Zhang Lu Wang, L. Y. X. W. Y. Z. J. L. X. G. L. L. C. S. X. L. (2016). A novel antimicrobial substance produced by *Lactobacillus rhamnosus* LS8. *Food Control*, 73, 754–760. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.028>
- McFARLAND, J. (1907). THE NEPHELOMETER:AN INSTRUMENT FOR ESTIMATING THE NUMBER OF BACTERIA IN SUSPENSIONS USED FOR CALCULATING THE OPSONIC INDEX AND FOR VACCINES. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, XLIX(14), 1176. <https://doi.org/10.1001/jama.1907.25320140022001f>
- Rodrigues MI, Costa P. Protimiza Experimental Design [Internet]. Campinas; 2025. Disponível em: <https://experimental-design.protimiza.com.br/>
- Schmidell, W., de Almeida Lima, U., Borzani, W., & Aquarone, E. (2001). *Biotecnologia industrial-vol. 2: Engenharia bioquímica* (Vol. 2). Editora Blucher.
- Shafi, A., Farooq, U., Akram, K., Jaskani, M., Siddique, F., & Tanveer, A. (2014). Antidiarrheal Effect of Food Fermented by Various Strains of *Lactobacillus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 229–239. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12056>

- Silvia D'Agostino Giulia Valentini, F. I. M. D. (2024). Effect of Probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus plantarum* on Caries and Periodontal Diseases: A Systematic Review. In *Dentistry Journal* (Vol. 12, Issue 4, p. 102). <https://doi.org/10.3390/dj12040102>
- Tao Wang Yingying Lu, H. Y. X. L. X. W. Y. S. Y. Y. B. L. Y. Z. X. L. (2019). Fermentation optimization and kinetic model for high cell density culture of a probiotic microorganism: *Lactobacillus rhamnosus* LS-8. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(3), 515–528. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02246-y>
- Xing Guo Jiaxin Chen, H. S. L. L. Y. G. Y. Y. X. W. Y. S. B. L. Y. Z. X. L. (2020). Mining, heterologous expression, purification and characterization of 14 novel bacteriocins from *Lactobacillus rhamnosus* LS-8. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 2162–2176. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.067>