



USO DA CITOMETRIA DE FLUXO COMO UMA METODOLOGIA EMERGENTE PARA AVALIAR A VIABILIDADE CELULAR PROBIÓTICA

Cássia Pereira Barros^a, Roberto Pessanha da Silva Pires^b, Mônica Queiroz de Freitas^a,

Adriano Gomes da Cruz^b

^a Universidade Federal Fluminense (UFF), Faculdade de Medicina Veterinária,

24230-340, Niterói, Brasil

^b Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ),

Departamento de Alimentos, 20270-021, Rio de Janeiro, Brasil

RESUMO

A quantificação bacteriana em uma formulação probiótica de forma precisa é imprescindível para garantir que o produto atingiu a dose mínima de células recomendada, cumprindo assim, os padrões regulamentares e a citação no rótulo. Métodos tradicionais de contagem em placas não enumeram com exatidão todos os probióticos disponíveis, apenas a população bacteriana capaz de se replicar sob meios de cultura em circunstâncias específicas. Portanto, não contabilizam as bactérias que sob condições ambientais estressantes tornam-se não cultiváveis, embora se mantenham metabolicamente ativas e possam retornar a capacidade de se replicar quando as condições se tornarem favoráveis novamente. Por outro lado, metodologias independentes de cultura, como a citometria de fluxo, possui uma definição mais abrangente e confiável da viabilidade bacteriana por incluir as bactérias viáveis mas não cultiváveis (VNC), discriminando subpopulações celulares vivas, danificadas e mortas com precisão e rapidez, facilitando assim, a rotina de laboratórios. Nesta revisão são abordados aspectos gerais da citometria de fluxo, bem como as principais vantagens da utilização para avaliação detalhada da viabilidade e funções fisiológicas celulares quando comparado às técnicas tradicionais de cultura.

Palavras-chave: probióticos, enumeração, viáveis mas não cultiváveis, plaqueamento, VNC



1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, diversas pesquisas científicas com ensaios clínicos e pré-clínicos tem demonstrado a importância da microbiota intestinal para afetar positivamente a saúde humana (Quigley et al., 2013; De Almada et al., 2015; Kristensen et al., 2016). Dessa forma, a abordagem dietética com o escopo de manipular a microbiota intestinal através do consumo de probióticos tem representado uma estratégia simples, de baixo custo e potencialmente eficaz através da otimização nutricional, prevenção e tratamento contra vários distúrbios ou doenças.

A forma como os probióticos são capazes de atuar modulando a microbiota intestinal do hospedeiro ainda é pouco conhecida, pois os mecanismos de ação que proporcionam os efeitos benéficos são difíceis de serem determinados em função do seu caráter multifatorial, que inclui: modificação da microbiota intestinal, secreção de substâncias antimicrobianas, aumento da adesão à mucosa e epitélio resultando na exclusão competitiva de patógenos, fortalecimento da barreira epitelial intestinal e modulação do sistema imunológico (Bermudez-Brito et al., 2012).

Embora os mecanismos subjacentes aos benefícios clínicos probióticos ainda não sejam totalmente compreendidos, vantagens atrativas como a segurança das cepas e as inúmeras evidências científicas associados ao seu consumo no alívio dos sintomas da diarreia, intolerância à lactose, síndrome do intestino irritável, colite ulcerativa (Domingos, 2017), controle do colesterol (Bordoni et al., 2013), níveis de pressão arterial (Chiang & Pan, 2012), diabetes, obesidade e contra certos tipos de câncer (Kerry et al., 2018), entre outros benefícios, tem contribuído para o crescente mercado consumidor em todo o mundo.



O mercado global de probióticos espera obter até 2023 um faturamento de cerca de US\$ 69,3 bilhões, com o setor de alimentos responsável por gerar maior valor econômico (Markets and Markets, 2017). No Brasil, o mercado de produtos probióticos está em ascensão devido à demanda dos consumidores por alimentos saudáveis e a indústria de alimentícia tem acompanhado essa tendência, disponibilizando diferentes opções de produtos alimentícios adicionados intencionalmente com probióticos (Pimentel et al. 2017). Os EUA, Europa e Japão correspondem a mais de 90% do mercado de alimentos funcionais em todo o mundo, a maior parte engloba lácteos funcionais (Marsh et al., 2014), principalmente produtos lácteos fermentados (Ozer & Kirmaci, 2010).

Desde meados da década de 90, os produtos lácteos fermentados têm recebido uma significativa atenção por conter bactérias probióticas em sua composição, representando o principal veículo de entrega de probióticos com concentrações em torno de 10^8 – 10^9 UFC, dependendo da ingestão diária recomendada para cada produto (Fontana et al. 2013). Para atender as exigências rigorosas do controle de qualidade e agências reguladoras referentes à qualidade, segurança e funcionalidade de preparações probióticas é fundamental que os produtos contenham a quantidade precisa de células informada no rótulo (Davis, 2014).

As metodologias tradicionais de enumeração bacteriana baseadas em cultura, avaliam apenas a capacidade da célula crescer e se multiplicar formando colônias em meios sintéticos sob condições específicas, desconsiderando o fato de que as células viáveis podem existir em estados metabólicos não cultiváveis, o que leva a contagens subestimadas. No entanto, metodologias independentes de cultura como a citometria de fluxo têm emergido como uma ferramenta alternativa e eficiente por determinar



populações bacterianas totais, contagens de células viáveis e viáveis mas não cultiváveis, além de fornecer informações sobre a integridade e as propriedades funcionais celulares de uma grande quantidade de amostras forma precisa e em tempo real para pesquisadores e cientistas da indústria de alimentos que enfrentam o desafio de fornecer a dose disponível para o produto final.

Diante do exposto, este artigo teve como objetivo realizar uma breve revisão sobre aspectos gerais da citometria de fluxo abordando princípios do funcionamento, as possíveis aplicações do método no âmbito da microbiologia, bem como as principais vantagens da utilização para monitoramento e enumeração de células viáveis em comparação à técnica convencional de plaqueamento ou contagem em placas.

Fatores que afetam a viabilidade celular probiótica

O termo “probiótico” tem origem grega e significa “para a vida”. Foi proposto para definir os microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde (Hill et al., 2014). Portanto, a viabilidade dos microrganismos probióticos é uma condição fundamental para que os efeitos benéficos proporcionados ao consumidor sejam observados. Dessa forma, torna-se necessário que os microrganismos se mantenham viáveis no alimento durante o processamento e no período de validade comercial do produto até a ingestão, além de serem capazes de sobreviver nas condições severas no ambiente gastrointestinal (Sarkar, 2013).

Os produtos lácteos possuem características intrínsecas consideradas ideais para conduzir as bactérias probióticas até o trato gastrointestinal (Soccol et al., 2010) em função da alta capacidade tamponante (Çaglar et al., 2011) e o efeito protetor dos componentes do leite durante a passagem pelo trânsito gastrointestinal (Ziarno &



Zareba, 2015). Os leites fermentados têm sido amplamente usados como carreadores para as cepas probióticas que podem ser adicionadas junto com as culturas starters, através da mistura de dois lotes de leite fermentado (um com a cepa probiótica no leite e outro com as culturas starters) ou até mesmo serem utilizadas como a própria cultura starter (Soccol et al. , 2010).

Por outro lado, a viabilidade dos probióticos em determinados alimentos ou sua inclusão durante o processamento representa obstáculos tecnológicos consideráveis para assegurar a sobrevivência desses microrganismos durante a validade comercial de matrizes alimentícias consideradas substratos estressantes, como suco / polpa de frutas ou alimentos desidratados, em função do pH e atividade água baixos, respectivamente (Anekella & Orsat, 2013; Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014). Até mesmo alimentos ideais, como o iogurte, tem vida útil limitada pelo estresse oxidativo sofrido pelos probióticos. Outro desafio é a necessidade de acrescentar os probióticos após o tratamento térmico devido a sua baixa resistência ao calor, o que aumenta as chances de contaminação microbiológica pós-processamento. Além de restringir a aplicação de probióticos em uma grande variedade de alimentos (Barros et al., 2020; De Almada et al., 2016).

Adicionalmente, o armazenamento por período prolongado muitas vezes culmina na redução da população bacteriana probiótica, principalmente as bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, que apesar de serem frequentemente empregadas em preparações probióticas para uso humano, não formam esporos para lidar com as condições adversas do ambiente, o que aumenta a dificuldade para se manterem na concentração desejada durante o prazo comercial do produto (Dash et al., 2015). Enquanto no ambiente gastrointestinal, fatores como o pH ácido no



estômago, a presença de sais biliares e gastroenzimas no intestino delgado, lisozima na saliva e ambientes que favorecem a competição com outros microrganismos (ex.:patógenos) podem reduzir a viabilidade das células probióticas nos alimentos funcionais (Mortazavian et al., 2012).

Portanto, o grande desafio tecnológico enfrentado pelos fabricantes de produtos alimentícios probióticos se deve a influência desses fatores relacionados à composição da matriz alimentar, às condições de processamento, armazenamento e ao ambiente gastrointestinal inóspito na viabilidade das culturas probióticas, aliados as diferentes características apresentadas pela mesma cepa probiótica quanto à capacidade imunoestimuladora devido às variações nas condições de fabricação e armazenamento (Cinque et al. , 2016; du Toit et al., 2013; Sousa et al., 2015).

Alguns estudos reportaram que os produtos probióticos comercializados tinham níveis significativamente mais baixos do que os relatados (Aureli et al., 2010; Begum et al., 2015). Nos EUA e Reino Unido somente 31% e 43% dos produtos probióticos comercialmente disponíveis, respectivamente, cumpriram sua alegação de rótulo (Drago et al., 2010; Fredua-Agyeman et al., 2016). Conforme mencionado anteriormente, para cumprir os critérios rigorosos no tocante à qualidade, segurança e funcionalidade probiótica é essencial quantificar com exatidão a população de microrganismos viáveis presentes no produto probiótico e expressar essa informação no rótulo. Vale ainda ressaltar que a concentração de microrganismos alegada deve ser mantida durante todo o período de vida útil do produto.



Técnicas para avaliação da viabilidade celular probiótica

A técnica convencional de plaqueamento ou contagem em placas, também conhecida como dependente de cultura tem sido amplamente utilizada para avaliar a viabilidade celular probiótica, sendo considerada a metodologia oficial na rotina de identificação de microrganismos vivos em amostras de alimentos (Hill et al., 2014). Entretanto, ela apenas enumera as células capazes de crescer e se multiplicar formando colônias visíveis em meios sólidos apropriados sob condições de tempo e temperatura previstos, não fornecendo informações sobre as propriedades estruturais, metabólicas, fisiológicas e genéticas das células bacterianas (Wilkinson, 2018).

Além disso, a técnica dependente de cultura requer um longo período de incubação (24 à 72h) de acordo com a cepa bacteriana, pode levar a uma contagem bacteriana subestimada quando ocorre o agrupamento de células com formação de cadeias. Adicionalmente, as cepas probióticas após exposição ao estresse induzido pelo processamento e armazenamento, como medida protetiva, podem entrar no estado viável mas não cultivável (VNC) em que permanecem metabolicamente ativas, porém dormentes, retornando ao estado fisiologicamente ativo com plena capacidade de se replicar quando as condições ambientais se tornarem favoráveis novamente (Lahtinen et al., 2008; Rault et al., 2007).

Portanto, métodos classificados como dependentes de cultura não quantificam as células mortas, irreparavelmente danificadas, assim como, as bactérias lesadas ou dormentes que apesar de serem incapazes de se multiplicar se mantêm biologicamente ativas, o que conseqüentemente, conduz a um número errôneo de microrganismos vivos que podem contribuir para as propriedades funcionais se as bactérias forem



probióticas ou pode se tornar motivo de preocupação para microbiologistas caso as bactérias sejam patogênicas (Ayari et al., 2013; Davis, 2014).

Por outro lado, o uso de técnicas alternativas independentes de cultura possuem uma definição mais abrangente e confiável da viabilidade bacteriana por incluir as bactérias viáveis mas não cultiváveis (VNC). São métodos de enumeração rápidos e diretos para pesquisadores e fabricantes de alimentos que precisam atingir a dose mínima de bactérias probióticas exigida para o produto final (Davis, 2014).

Entre as metodologias independentes de cultura utilizadas para enumerar as bactérias probióticas destacam-se aquelas que se baseiam na presença de ácido nucleico, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que pode ser quantitativo em tempo real (PCRq) ou transcriptase reversa (PCR-TR), espectrofotometria de massa MALDI-TOF, quantificação de 16S RNAr; e ainda aquelas fundamentadas na integridade celular, como: ensaio de viabilidade combinado com microscopia de epifluorescência, hibridização fluorescente in situ (FISH). Entretanto, tais métodos estão bem descritos por Davis (2014) e não serão discutidos aqui.

Outro exemplo de técnica alternativa independente de cultura que envolve não só a integridade celular, mas também a atividade metabólica para enumeração bacteriana é a citometria de fluxo, uma tecnologia que combina dispersão de luz e emissão de fluorescência para detectar células com vários estados estruturais, fisiológicos e genéticos distintos (Wilkinson, 2018). Embora tenha sido inicialmente criada há mais de 30 anos para contagem de células vermelhas, apenas recentemente a citometria de fluxo foi atualizada para analisar células muito menores, como as bactérias (Aebischer et al., 2017).



Citometria de fluxo: aspectos gerais

A citometria de fluxo permite uma descrição detalhada da viabilidade bacteriana com informações em relação à integridade e as propriedades funcionais celulares. A obtenção dessas informações é extremamente importante, uma vez que evidências científicas recentes comprovaram que muitos efeitos benéficos dos probióticos estão relacionados à sua estrutura celular, atividade metabólica e subprodutos do metabolismo bacteriano, como bacteriocinas, ácidos orgânicos, etanol, diacetil, acetaldeídos e peróxido de hidrogênio (Collado et al., 2019; Kerry et al., 2018). Além disso, observou-se que as células mortas ou seus subprodutos também podem ter algum efeito funcional probiótico no hospedeiro (Barros et al., 2020; Piqué et al., 2019; Sarkar, 2018).

Nesse sentido, a citometria de fluxo tem sido apontada como uma técnica promissora por fornecer resultados precisos de múltiplos parâmetros celulares concomitantemente de forma rápida e direta, pois os dados são adquiridos em tempo real (1-2min), e possibilitar a análise de mais de dez mil células por amostra, o que reflete em alta produtividade. Além de ser menos extenuante e ocupar menor espaço quando comparada à técnica convencional de contagem em placas (Wilkinson, 2016, 2018).

A metodologia consiste no uso de um instrumento automatizado que combinado com corantes fluorescentes, também referidos como marcadores, manchas, sondas ou fluorocromos é capaz de identificar, enumerar e caracterizar as propriedades funcionais das células (Arku et al., 2011). Isso ocorre porque a emissão de fluorescência das células coradas e a dispersão de luz são detectadas e convertidas



em dados gráficos que transmitem tais informações sobre as células presentes na amostra (Aebisher et al., 2017).

Em resumo, a suspensão com as bactérias coradas é bombeada dentro de uma corrente líquida (fluido da bacia). À medida que cada célula, individualmente, passa por um ponto dentro do caminho de um fluxo estreito, ela é interceptada por um laser que dispersa a luz em duas direções principais, conhecidas como Dispersão de luz frontal ou FSC e Dispersão de luz de ângulo lateral ou SSC. O FSC e SSC podem diferenciar, em segundos, as células conforme o seu tamanho e granularidade, respectivamente. A excitação a laser das moléculas fluorescentes permite que elas emitam luz com diferentes comprimentos de onda, sendo que a quantidade e o tipo de sinais de fluorescência coletados indicam o percentual de vários tipos de células ou componentes celulares presentes (Davis, 2014; Léonard et al., 2016; Wilkinson, 2018).

Os corantes são capazes de detectar alterações nos parâmetros biológicos celulares, como atividade enzimática intracelular e citoplasmática, funcionalidade do potencial de membrana, integridade da membrana celular, atividade respiratória e pH citoplasmático (Rault et al., 2008; Chen et al., 2011; Doherty et al., 2010; Wilkinson, 2016). Desse modo, informações complementares sobre as características fisiológicas e a estrutura celular bacteriana podem ser obtidos pelo uso de corantes fluorescentes específicos. Além disso, combinações de corantes também são frequentemente utilizadas para gerar dados múltiplos de células individuais dentro de populações heterogêneas ou em subpopulações menores de acordo com seu estado fisiológico (Aebisher et al., 2017; Wilkinson, 2018).



Os corantes mais amplamente utilizados na citometria de fluxo para mensurar a viabilidade celular bacteriana probiótica e suas respectivas funções são descritos a seguir:

- ✓ Diacetato de Fluoresceína (FDA) e Diacetato de carboxifluoresceína (cFDA) são substratos de esterase não fluorescentes usados com o objetivo de indicar a presença de atividade enzimática intracelular e avaliar a integridade da membrana. As células com metabolismo ativo produzem enzimas com atividade de esterase, uma vez dentro da célula, os grupos diacetato são hidrolisados liberando o composto verde fluorescente fluoresceína (F) / carboxifluoresceína (cF), respectivamente, ambos impermeáveis à membrana. Assim, apenas as células com membranas intactas permanecerão fluorescentes (Ferrario & Guerrero, 2017; Rodrigues et al., 2019);
- ✓ Ácido (bis- 1,3-dibutilbarbitúrico) trimetina oxonol (DiBAC4(3)) ou BOX é usado para medir o potencial de membrana. O BOX é um corante aniônico que penetra em bactérias sem potencial de membrana/despolarizadas (lesadas ou mortas) e se liga a compostos ricos em lipídios resultando em fluorescência verde (Anvarian et al., 2018);
- ✓ Éster succinimidílico diacetato de carboxifluoresceína (cFDA-SE) empregado para analisar alterações no pH intracelular correlacionando-se à viabilidade bacteriana, cuja emissão de fluorescência indica aumento do pH intracelular e, consequentemente a presença de bactérias vivas (Rault et al., 2008);



- ✓ Iodeto de Propídio (PI) e TOTO-1 são corantes de ácido nucléico usados com a finalidade de avaliar a integridade da membrana citoplasmática. São excluídos pela célula intacta, porém, permeáveis às células com membrana danificada/comprometida, se difundem facilmente dentro da célula e coram o DNA emitindo fluorescência vermelha (Bunthof & Abee, 2002; Rodrigues et al., 2019);
- ✓ Iodeto de 3,3'-di-hexiloxacarbocianina (DiOC₆(3)) é um corante de cianina, assim como o BOX detecta alterações no potencial de membrana da célula. Porém trata-se de um corante catiônico que se acumula no interior de células hiperpolarizadas, ou seja, cora as células danificadas. Enquanto na célula intacta, a fluorescência de DiOC₆(3) diminui como consequência do colapso do potencial de membrana (Salar-Behzadi et al., 2013; Souza et al., 2009);
- ✓ Laranja Tiazole (TO) e SYTO₉ são corantes de ácido nucléico usados para a determinação da contagem total de células. São corantes permeantes que atravessam a membrana citoplasmática de todas as células (vivas, feridas e mortas) e se intercalam ao DNA bacteriano emitindo fluorescência verde. Podem inclusive serem usados em dupla coloração com o PI para discriminar células vivas e mortas em relação à integridade da membrana (Ambros, et al., 2018; Gao et al., 2018; Michelutti et al., 2020).



Aplicações na microbiologia

No âmbito da microbiologia, a citometria de fluxo pode ser aplicada para diversas finalidades, como: detecção e diagnósticos de doenças (Aebisher et al., 2017), tratamento e controle da qualidade microbiológica da água potável (Egli & Kotzsch, 2015), avaliar o efeito de tratamentos antimicrobianos (Léonard et al., 2016), monitoramento da fermentação na cerveja e no vinho (Overton, 2015; Longin et al., 2017), testes farmacêuticos e ambientais (Herrero e Diaz, 2015), na indústria de laticínios (Doolan et al., 2014; Yanachkina et al., 2016) e na fabricação de culturas e produtos probióticos (Davis, 2014; Raymond & Champagne, 2015).

Em relação às aplicações industriais, em linhas gerais, a citometria de fluxo está relacionada à análise de alimentos e bebidas para detecção de forma rápida de contaminação por microrganismos patogênicos e / ou deteriorantes; ao controle e melhorias de bioprocessos (tratamentos com calor, alta pressão, baixa temperatura) e, principalmente, a avaliação da viabilidade bacteriana, questão fundamental durante a elaboração de produtos probióticos com o intuito de determinar as mudanças no estado fisiológico dos microrganismos causados pelo estresse após as etapas de processamento e período de armazenamento (Diaz et al., 2010; Herrero e Diaz, 2015, Rault et al., 2007; Salar-Behzadi et al., 2013).

Embora a técnica de citometria de fluxo esteja ganhando popularidade entre os microbiologistas, a aplicação especificamente para a pesquisa com probióticos ainda é pouco relatada e vem sendo explorada para avaliação detalhada da viabilidade celular, discriminando as bactérias vivas, mortas e danificadas num dado produto e/ou principalmente para investigar a extensão dos possíveis danos celulares estruturais e/ou metabólicos induzidos por novas tecnologias ou formulações, combinações de



processos período de armazenamento ou simulação das condições gastrointestinais com rapidez e precisão, conforme alguns exemplos descritos a seguir (Tabela 1).

Tabela 1. Análise da viabilidade celular probiótica por citometria de fluxo.

Microrganismo/ produto	Corante	Objetivo	Referência
<i>Leuconostoc lactis</i> L60, <i>Lactobacillus helveticus</i> T97, <i>Lactobacillus casei</i> R, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Pediococcus acidilacti</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i>	cFDA PI TOTO-1	Discriminar bactérias probióticas vivas/mortas após exposição à bile, sal e ácido	Bunthof et al., (2001)
<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS no leite, fermentos lácteos e produtos probióticos	cFDA, TOTO-1 SYTO9	Avaliar viabilidade bacteriana em produtos lácteos e probióticos	Bunthof & Abee (2002)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	cFDA PI	Caracterizar o comportamento fisiológico / metabólico da cepa após tratamento por alta pressão	Ananta et al., (2004)
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CNRZ 208T, <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CFL1, <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CIP 101027T e <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ITG LL57	cFDA PI	Comparar a viabilidade das quatro cepas durante e após o congelamento	Rault et al., (2007)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CFL1	cFDA PI BOX cFDA-SE	Quantificar a integridade e despolarização da membrana, atividade da esterase intracelular e pH intracelular durante a fermentação	Rault et al., (2008)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 e <i>Bacillus licheniformis</i> CCM 1034	PI DioC ₆ (3)	Monitorar as cepas durante a fermentação	Silva et al., (2009)



<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG em matrizes de proteínas complexas	TO PI	Analisar viabilidade de bactérias probióticas submetidas ao calor, armazenamento e acidez	Doherty et al., (2010)
<i>Lactobacillus reuteri</i> DPC16	cFDA PI	Quantificar respostas do probiótico a diferentes concentrações de sais biliares	Chen et al., (2011)
<i>Bifidobacterium bifidum</i> BB-12	PI FDA DioC ₆ (3)	Comparar as alterações nas propriedades celulares com / sem protetores durante secagem por atomização e após armazenamento	Salar-Behzadi et al., (2013)
<i>Bifidobacterium bifidum</i> LMG 11041, <i>B. longum</i> LMG 13197 e <i>B. lactis</i> Bb12	PI SYTO9	Elucidar o mecanismo e extensão de danos do extrato de alho sobre bifidobacterias	Booyens & Thantsha (2014)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Bifidobacterium longum</i>	cFDA PI	Investigar o efeito de diferentes concentrações de sal na viabilidade e integridade da membrana e comparado ao plaqueamento	Gandhi & Shah (2015)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> no chocolate e barra de cereal	PI SYTO9	Determinar contagem de células totais e viáveis	Raymond & Champagne (2015)
<i>Lactobacillus</i> spp.	cFDA PI	Avaliar a viabilidade de isolados de <i>Lactobacillus</i> sob diferentes valores de pH	Olszewska et al., (2016)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KE 162 no suco de maçã	FDA PI	Investigar os danos causados pelo ultrassom único ou combinado com tecnologia de luz pulsada	Ferrario & Guerrero (2017)
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> F19 (<i>Lb. paracasei</i>), <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> INL1	TO PI	Investigar a integridade da membrana após secagem por congelamento de micro-ondas	Ambros et al., (2018)
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC BAA-2753 na cápsula BIFICO	SYTO9 PI	Diferenciar células vivas / mortas e comparar com plaqueamento	Gao et al., (2018)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5, <i>Bifidobacterium animalis</i> BB12 no	cFDA PI	Diferenciar células vivas / mortas / danificadas após digestão simulada	Rodrigues et al., (2019)



sorvete, leite fermentado e suplemento alimentar		comparando ao plaqueamento	
<i>Lactobacillus helveticus</i> R0052	SYTO9 PI	Determinar contagem de células viáveis em iogurtes grego durante o armazenamento após processamento por ultrafiltração / centrifugação comparado à agitação regular como controle	Moineau-Jean et al., (2019)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium animalis</i>	TO PI	Determinar contagem de células viáveis comparado à contagem em placas	Michelutti et al., (2020)

2. CONCLUSÃO

A maioria dos estudos para a enumeração da viabilidade celular probiótica baseia-se nas técnicas convencionais de culturabilidade, que possuem algumas limitações, como o longo período de incubação das cepas, custos laboratoriais e o fato de desconsiderar que as células viáveis podem existir em estados metabólicos não cultiváveis, resultando em contagens subestimadas. No entanto, a citometria de fluxo representa uma ferramenta alternativa extremamente valiosa para atender a demanda de pesquisadores e fabricantes de alimentos por enumerar e fornecer informações detalhadas sobre a fisiologia e propriedades funcionais celulares de um grande volume de amostras com precisão e em tempo real.

Diante do exposto, recomenda-se o uso da citometria de fluxo combinada com corantes fluorescentes para quantificar as bactérias probióticas e monitorar a atividade metabólica desses microrganismos durante o bioprocessamento e ao longo de todo o período de armazenamento auxiliando no controle de qualidade dos produtos durante



sua validade comercial, bem como investigar o impacto de novas tecnologias e formulações nas funções morfológicas e celulares das cepas probióticas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebisher, D., Bartusik, D. & Tabarkiewicz, J. (2017). Laser flow cytometry as a tool for the advancement of clinical medicine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 85, 434-443.

Ambros, S., Mayer, R., Schumann, B. & Kulozik, U. (2018). Microwave-freeze drying of lactic acid bacteria: Influence of process parameters on drying behavior and viability. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 48, 90-98.

Ananta, E., Heinz, V. & Knorr, D. (2004) Assessment of high pressure induced damage on *Lactobacillus rhamnosus* GG by flow cytometry. *Food Microbiology*, 21, 567–577.

Anekella, K. & Orsat, V. (2013). Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 50, 17-24.

Anvarian, A.H.P., Smith, M.P. & Overton, T.W. (2018). Use of flow cytometry and total viable count to determine the effects of orange juice composition on the physiology of *Escherichia coli*. *Food Science & Nutrition*. 6, 1817-1825.

Arku, B., Fanning, S. & Jordan, K. (2011). Flow cytometry to assess biochemical pathways in heat-stressed *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*). *Journal of Applied Microbiology*, 111, 616-624.

Aureli, P., Fiore, A., Scalfaro, C., Casale, M. & Franciosa, G. 2010. National survey outcomes on commercial probiotic food supplements in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 265-273.

Ayari, S., Dussault, D., Hayouni, E.A., Hamdi, M. & Lacroix, M. (2013). Radiation tolerance of *Bacillus cereus* pre-treated with carvacrol alone or in combination with nisin after exposure to single and multiple sub-lethal radiation treatment. *Food Control*, 32, 693–701.



Barros, C.P., Guimarães, J.T., Esmerino, E.A., Duarte, M.C.K.H., Silva, M.C., Silva, R., Ferreira, B.M., Sant'Ana, A.S., Freitas, M.Q., Cruz, A.G. (2020). Paraprobiotics and postbiotics: concepts and potential applications in dairy products. *Current Opinion in Food Science*. 32, 1-8.

Begum, A.A., Jakaria, D.M., Anisuzzaman, S., Islam, M. & Mahmud, S.A. (2015) Market assessment and product evaluation of probiotic containing dietary supplements available in Bangladesh market. *Journal of Pharmacology*, 763796, 1-5.

Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Lorente, C. & Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 61, 160-174.

Betoret, N., Puente, L., Díaz, M. J., Pagan, M. J., García, M. J., Gras, M. L., Martínez-Monzó, J. & Fito, P. (2003). Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering*, 56, 273-277.

Booyens, J. & Thantsha, M.S. (2014). Fourier transform infra-red spectroscopy and flow cytometric assessment of the antibacterial mechanism of action of aqueous extract of garlic (*Allium sativum*) against selected probiotic *Bifidobacterium* strains. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 289.

Bordoni, A., Amaretti, A., Leonardi, A., Boschetti, E., Danesi, F., Matteuzzi, D., Roncaglia, L., Raimondi, S. & Rossi, M. (2013). Cholesterol-lowering probiotics: In vitro selection and in vivo testing of bifidobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 8273-8281.

Bunthof, C.J. & Abee, T. (2002). Development of a Flow Cytometric Method To Analyze Subpopulations of Bacteria in Probiotic Products and Dairy Starters. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2934–2942.

Bunthof, C.J., Bloemen, K., Breeuwer, P., Rombouts, F.M. & Abee, T. (2001). Flow Cytometric Assessment of Viability of Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2326–2335.



Çaglar, E., Sandalli, N., Kuscü, O.O. & Kargul, B. (2011). The buffering capacity of probiotic yogurt. *Acta Stomatologica Croatica*, 45, 41-45.

Chen, S., Ferguson, L.R., Shu, Q. & Garg, S. (2011). The application of flow cytometry to the characterisation of a probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DPC16 and the evaluation of sugar preservatives for its lyophilization. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1873-1879.

Chiang, S. & Pan, T. (2012). Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 903-916.

Cinque, B., La Torre, C., Lombardi, F., Palumbo, P., Van der Rest, M. & Cifone, M.G. (2016). Production conditions affect the in vitro anti-tumoral effects of a high concentration multistrain probiotic preparation, *PLoS ONE*, 11, 1-19.

Colombo, M., Todorov, S.D., Eller, M. & Nero, L.A. (2018). The potential use of probiotic and beneficial bacteria in the Brazilian dairy industry. *Journal of Dairy Research*, 85, 487-496.

Collado M.C., Vinderola, G., Salminen, S. (2019). Postbiotics: facts and open questions. A position paper on the need for a consensus definition. *Beneficial Microbes*, 10, 711-719.

Dash, G., Raman, R. P., Prasad. K.P., Makesh, M., Pradeep, M.A. & Sen, S. (2015). Evaluation of paraprobiotic applicability of *Lactobacillus plantarum* in improving the immune response and disease protection in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). *Fish & Shellfish Immunology*, 43, 167-174.

Davis, C. (2014). Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 103, 9-17.

de Almada, C.N., Almada, C.N., Martinez, R.C. & Sant'Ana, A.S. (2015). Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 4175-4199.



de Almada, C.N., Almada, C.N., Martinez, R.C.R. & Sant'ana, A.S. (2016). Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends Food Science & Technology*, 58, 96-114.

Diaz, M., Herrero, M., Garcia, A. & Quiros, C. (2010). Application of flow cytometry to industrial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, 48, 385–407.

Doherty, S. B., Wang, L., Ross, R. P., Stanton, C., Fitzgerald, G.F. & Brodkorb, A. (2010). Use of viability staining in combination with flow cytometry for rapid viability assessment of *Lactobacillus rhamnosus* GG in complex protein matrices. *Journal of Microbiological Methods*, 82, 301-310.

Doolan, I. A., Nongonierma, A. B., Kilcawley, K.N. & Wilkinson, M.G. (2014). Partitioning of starter bacteria and added exogenous enzyme activities between curd and whey during Cheddar cheese manufacture. *International Dairy Journal*, 34, 159-166.

Domingos, J.J.S. (2017). Review of the role of probiotics in gastrointestinal diseases in adults. *Gastroenterología y Hepatología*, 40, 417-429.

Drago, L., Rodighiero, V., Celeste, T., Rovetto, L. & De Vecchi, E. (2010). Microbiological evaluation of commercial probiotic products available in the USA in 2009. *Journal of Chemotherapy*, 22, 373-377.

du Toit, E., Vesterlund, S., Gueimonde, M. & Salminen, S. (2013). Assessment of the effect of stresstolerance acquisition on some basic characteristics of specific probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 165, 51-56.

Egli, T. & Kotzsch, S. (2015). Flow cytometry for rapid microbiological analysis of drinking Water: From science-an unfinished story. In M. G. Wilkinson (Ed.). *Flow cytometry in Microbiology: Technology and applications* (pp. 175–216). Norfolk, UK: Caister Academic Press.



Ferrario, M. & Guerrero, S. (2017). Impact of a combined processing technology involving ultrasound and pulsed light on structural and physiological changes of *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 in apple juice. *Food Microbiology*, 65, 83-94.

Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Munoz-Quezada, S. & Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 109, 35-50.

Fredua-Agyeman, M., Parab, S. & Gaisford, S. (2016). Evaluation of commercial probiotic products. *British Journal of Pharmacology*, 1, 84-89.

Gao, Y., Yu, H-J. & Wen, B. (2018). The use of fluorescent techniques in combination with flow cytometry for fast counting of *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-2753 in BIFICO capsule. *Food Science and Biotechnology*, 2, 1405–1410.

Gandhi, A. & Sha, N.P. (2015). Effect of salt on cell viability and membrane integrity of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum* as observed by flow cytometry. *Food Microbiology*, 49, 197-202.

Herrero, M. & Diaz, M. (2015). Application of flow cytometry to environmental biotechnology. In M. G. Wilkinson (Ed.). *Flow cytometry in Microbiology: Technology and applications* (pp. 59–75). Norfolk, UK: Caister Academic Press.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merestein, D.J., Pot, D.B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C. & Sanders, M.E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11, 506–514.

Kerry, R.G., Patra, J.K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H-S. & Das, G. (2018) Benefaction of probiotics for human health: a review. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26, 927–939.

Krasaekoopt, W. & Watcharapoka, S. (2014). Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate



beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT - Food Science and Technology*, 57, 761-766.

Kristensen, N.B., Bryrup, T., Allin, K.H., Nielsen, T., Hansen, T.H. & Pedersen, O. (2016). Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. *Genome Medicine*, 8, p. 52.

Lahtinen, S.J., Ahokoski, H., Reinikainen, J.P., Gueimonde, M., Nurmi, J., Ouwenhand, A.C. & Salminen, S.J. (2008). Degradation of 16S rRNA and attributes of viability of viable but nonculturable probiotic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. 46, 693–698.

Léonard, L., Chibane, L.B., Bouhedda, B.O., Degraeve, P. & Oulahal, N. (2016). Recent Advances on Multi-Parameter Flow Cytometry to Characterize Antimicrobial Treatments. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1225.

Longin, C., Petitgonnet, C., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., & Alexandre, H. (2017). Application of flow cytometry to wine microorganisms. *Food Microbiology*, 62, 221–231.

Markets and Markets: Probiotics market by application (functional food & beverages (dairy, non-dairy beverages, baked goods, meat, cereal), dietary supplements, animal feed), source (bacteria, yeast), form (dry, liquid), end user (human, animal), and Region- Global Forecast to 2023. (2017). Disponível em: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/probiotic-market-advanced-technologies-and-global-market-69>.

Marsh, A.J., Hill, C., Ross, R.P. & Cotter, P.D. (2014). Fermented beverages with health-promoting potential: past and future perspectives. *Trends in Food Science and Technology*, 38, 113-124.



Michelutti, L., Bulfoni, M. & Nencioni, E. (2020). A novel pharmaceutical approach for the analytical validation of probiotic bacterial count by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods*. 170, 105834.

Moineau-Jean, A., Champagne, C.P., Roy, D., Raymond, Y. & LaPointe, G. (2019). Effect of Greek-style yoghurt manufacturing processes on starter and probiotic bacteria populations during storage. *International Dairy Journal*. 93, 35-44.

Mortazavian, A.M., Mohammadi, R. & Sohrabvandi, S. (2012). Delivery of probiotic microorganisms into gastrointestinal tract by food products, in Brzozowski, T. (Ed.), *New Advances in the Basic and Clinical Gastroenterology*, InTech, Croatia.

Olszewska, M.A., Kocot, A.M., Nynca, A. & Łaniewska-Trokenheima, Ł. (2016). Utilization of physiological and taxonomic fluorescent probes to study Lactobacilli cells and response to pH challenge. *Microbiological Research*, 192, 239-246.

Overton, T. W. (2015). Flow cytometry of yeasts and other fungi. In M. G. Wilkinson (Ed.). *Flow cytometry in Microbiology: Technology and applications* (pp. 119–158). Norfolk, UK: Caister Academic Press.

Ozer, B.H. & Kirmaci, H.A. (2010). Functional milks and dairy beverages. *International Journal of Dairy Technology*, 63, 1-15.

Pimentel, T.C., Garcia, S. & Prudencio, S.H. (2017). Produtos lácteos funcionais. In *Produção, Processamento e Fiscalização de Leite e Derivados*, Vol. 1, p. 205–226 (Eds. LA Nero, AG Cruz & LS Bersot). Atheneu: São Paulo, SP, Brasil.

Quigley, E.M.M. (2013). Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterology & Hepatology*, 9, 560-569.

Piqué, N., Berlanga, M. & Miñana-Galbís, D. (2019). Health Benefits of Heat-Killed (Tyndallized) Probiotics: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 2534.

Rault, A., Béal, C., Ghorbal, S., Ogier, J-C. & Bouix, M. (2007). Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology*, 55, 35-43.



Rault, A., Bouix, M. & Béal, C. (2008). Dynamic analysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 physiological characteristics during fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 559–570.

Raymond, Y. & Champagne, C.P. (2015). The use of flow cytometry to accurately ascertain total and viable counts of *Lactobacillus rhamnosus* in chocolate. *Food Microbiology*, 46, 176-183

Rodrigues, V.C.C., Silva, L.G.S., Simabuco, F.M., Venema, K. & Antunes, A.E.C. (2019). Survival, metabolic status and cellular morphology of probiotics in dairy products and dietary supplement after simulated digestion. *Journal of Functional Foods*, 55, 126-134.

Salar-Behzadi, S., Wu, S., Toegel, S., Hofrichter, M., Altenburger, I., Unger, F. M., Wirth, M. & Viernstein, H. (2013). Impact of heat treatment and spray drying on cellular properties and culturability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12. *Food Research International*, 54, 93-101.

Sarkar, S. (2013). Microbiological Considerations for Probiotic Supplemented Foods. *International Journal of Microbiology & Advanced Immunology*, 1, 1-7.

Silva, T.L., Piekova, L., Mileu, J. & Roseiro, J.C. (2009). A comparative study using the dual staining flow cytometric protocol applied to *Lactobacillus rhamnosus* and *Bacillus licheniformis* batch cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 134-138.

Soccol, C.R.; Vandenberghe, L.P.; Spier, M.R., Medeiros, A.B.P., Yamaguishi, C.T., Lindner, J.D., Pandey, A. & Soccol, V.T. (2010). The potential of probiotics: a review. *Food Technology Biotechnology*, 48, 413-434.

Sousa, S., Gomes, A.M., Pintado, M.M., Silva, J.P., Costa, P., Amaral, M.H., Duarte, A.C., Rodrigues, D., Rocha-Santos, T.A.P. & Freitas, A.C. (2015). Characterization of freezing effect upon stability of, probiotic loaded, calcium-alginate microparticles. *Food and Bioproducts Processing*, 93, 90-97.

Wilkinson, M.G. (2016). Flow cytometry in food Microbiology: Challenges, opportunities and progress to date. (2016). *Técnicas de Laboratório*, 417, 722-728.



Wilkinson, M.G. (2018). Flow cytometry as a potential method of measuring bacterial viability in probiotic products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 1-10.

Yanachkina, P., McCarthy, C., Guinee, T. & Wilkinson, M. (2016). Effect of varying the salt and fat content in Cheddar cheese on aspects of the performance of a commercial starter culture preparation during ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 224, 7-15.

Ziarno, M. & Zareba, D. (2015). Effects of milk components and food additives on survival of three bifidobacteria strains in fermented milk under simulated gastrointestinal tract conditions. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26, 27812.