

ENUMERAÇÃO E ATIVIDADE ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS ISOLADAS DE IOGURTES BRASILEIROS¹

Laís Gonçalves Botelho², Adriano França da Cunha³, Rayssa Gomes Alves⁴,
Eduardo Nogueira Fernandes², Natália Parma Augusto de Castilho⁵;
Viviane Gomes Lelis⁶

Resumo: *Iogurtes possuem bactérias ácido lácticas que exercem efeitos benéficos aos consumidores, desde que em quantidades mínimas satisfatórias. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antagonista e enumerar bactérias ácido lácticas de cinco lotes de quatro marcas de iogurtes brasileiros comercializados em Viçosa (MG). A enumeração de bactérias ácido lácticas foi feita em meio MRS e a atividade antagonista foi realizada de acordo com técnica de antimicrobiano modificada contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* e *Escherichia coli* e bactéria isolada de um dos iogurtes. Observou-se que apenas uma amostra de uma marca de iogurte teve contagem em conformidade com legislação brasileira, ou seja, acima de 10⁷ UFC/mL. Não foi observada atividade antagonista das bactérias ácido lácticas frente as bactérias patogênicas e a bactéria ácido láctica isolada de um dos iogurtes. Isto demonstra que os produtos não exercem atividade probiótica satisfatória aos consumidores. Indústrias e estabelecimentos comerciais devem ter melhor controle durante o processamento e armazenamento de iogurtes, a fim de garantir a qualidade do produto ao consumidor.*

Palavras-chave: *Fermentação, leite, patógeno, probiótico*

Abstract: *Lactic acid bacteria of yogurt that have beneficial effects for consumers,*

¹ Parte do Trabalho de Conclusão de Curso do primeiro autor;

² Graduando(a) em Medicina Veterinária – FACISA/UNIVIÇOSA. e-mail: laisgbb@yahoo.com.br; eduardo_soad_@hotmail.com;

³ Professor em Medicina Veterinária – FACISA/UNIVIÇOSA. e-mail: adrianofcunha@hotmail.com.br

⁴ Graduanda em Engenharia Química – FACISA/UNIVIÇOSA. e-mail: rays-salves@hotmail.com;

⁵ Médica Veterinária – FACISA/UNIVIÇOSA. e-mail: nataliaparma@hotmail.com

⁶ Professora em Nutrição – FACISA/UNIVIÇOSA. e-mail: vivianegomeslelis@gmail.com

since in satisfactory minimum quantities. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antagonist and count of lactic acid bacteria of five lots of four brands in Brazilian yogurts sold in Viçosa (MG). The enumeration of lactic acid bacteria was made on MRS medium and the antagonistic activity was performed according to the modified technique antimicrobial against Staphylococcus aureus, Salmonella enterica, Escherichia coli and a bacteria isolated from yoghurt. It was observed that only one sample of one brand of iogurte have accordance with Brazilian legislation, above 10⁷ CFU/mL. There was no antagonist activity of lactic acid bacteria front pathogenic bacteria and lactic acid bacteria isolated from one of the yogurts. This demonstrates that the products do not perform satisfactory probiotic activity to consumers. Industries and supermarkets should have better control during processing and storage of yogurt, to ensure product quality to the consumer.

Keywords: *Fermentation, milk, pathogen, probiotic*

Introdução

Iogurte é o leite fermentado obtido pela ação dos microrganismos Streptococcus salivarius ssp. thermophilus e Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus. Além de ser uma rica fonte de proteínas, cálcio, fósforo e vitaminas, suas bactérias ácido lácticas podem exercer uma série de efeitos benéficos que incluem aumento da resposta imune, equilíbrio da microbiota intestinal, efeitos adjuvante em vacinas, redução das enzimas fecais que podem resultar na iniciação dos cânceres, associação no tratamento da diarreia associado com terapias de antibióticos, controle de colite e prevenção de úlceras (SAAD, 2006).

A atividade antagonista de espécies de bactérias ácido lácticas contra microrganismos indesejáveis permite importante perspectiva tecnológica de utilização destes microrganismos para a conservação de alimentos e controle de patógenos. Esta atividade inibitória se deve à fermentação da lactose do leite em ácido láctico e substâncias responsáveis por diferentes atividades bactericidas e bacteriostáticas (ALEXANDRE *et al.*, 2002).

Entretanto, é conhecido que o efeito benéfico no organismo está relacionado com a concentração de bactérias probióticas no lúmen do intestino do hospedeiro, o que muitas vezes depende da quantidade destas bactérias no produto consumido (ARAÚJO et al., 2009). A legislação estabelece que o iogurte a ser consumido deve conter uma quantidade mínima de bactérias ácido láticas viáveis de 10⁷ UFC/g de produto, durante seu prazo de validade (BRASIL, 2007). Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antagonista e enumerar bactérias ácido láticas em iogurtes brasileiros comercializados em Viçosa (MG).

Material e Métodos

A pesquisa foi aprovada pelo Núcleo de Pesquisa e Extensão (NUPEX) da Faculdade União do Ensino Superior de Viçosa (UNIVIÇOSA) sob número de protocolo 038/2014-I. Para realização do experimento, foram coletados cinco lotes de quatro marcas de iogurtes parcialmente desnatados (A, B, C e D) em estabelecimentos comerciais da cidade de Viçosa (MG), totalizando 20 amostras. Tais amostras foram transportadas em caixa de isopor com gelo até aos Laboratórios de Química e Microbiologia da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde/UNIVIÇOSA de Viçosa, onde foram realizadas as análises.

Para contagem de bactérias ácido láticas, as amostras foram submetidas a diluições (10⁻⁵, 10⁻⁶ e 10⁻⁷) em solução salina 0,85% (p/v) e, posteriormente, uma alíquota de 100µL de cada diluição, em duplicata, foi vertida sobre a placa de Petri contendo meio ágar Mann, Roggosa e Sharpe (MRS - Difco, Detroit, United States) (5,5 % de meio / 1,5 % ágar). Os inóculos foram espalhados com auxílio de uma alça de Drigalski nas placas, que foram incubadas por 48 horas a 37°C, sob aerobiose. A contagem de bactérias nas placas que apresentavam até 250 colônias foi multiplicada por 10 e pelo inverso da diluição selecionada. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia por mL do produto (UFC/mL).

O teste de antagonismo *in vitro* foi realizado de acordo com a técnica descrita por TAGG *et al.* (1976), em duplicata. Após duas ativações das bactérias ácido lácticas isoladas em caldo MRS (Difco) a 37°C, por 48 horas, e sob aerobiose, 10 µL dos cultivos foram inoculados no centro de placas de Petri (spot) contendo ágar MRS (Difco) e incubados a 37°C, sob aerobiose, por 48 horas. Então, clorofórmio foi adicionado nas tampas das placas, deixando-se agir por trinta minutos a fim de eliminar os micro-organismos cultivados, mas mantendo as possíveis substâncias inibidoras.

Bactérias indicadoras *Salmonella enterica* subsp. *Typhimurium* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 29313 e *Escherichia coli* ATCC 25922 foram adquiridas do banco de bactérias da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Uma bactéria ácido láctica produtora de um iogurte também foi utilizada como bactéria indicadora, depois de caracterização morfo tintorial. Todas as bactérias indicadoras foram ativadas duas vezes a 37°C, por 24 horas, sob aerobiose.

Em seguida, 10µL dos cultivos de bactérias indicadoras indesejáveis e desejáveis foram transferidos, respectivamente, para 5mL de ágar BHI (3,7 % de meio / 1,5 % de ágar) (Oxoid, Basingstoke, England) e MRS (Difco) semi-sólidos (5,5 % de meio / 0,75 % de ágar) em tubos de ensaio e vertidos sobre as placas de ágar MRS (Difco) contendo as amostras de bactérias ácido lácticas (spot) após ação do clorofórmio. As placas foram incubadas a 37°C, durante 24 horas, sob aerobiose. A medida dos halos de inibição foi realizada com paquímetro digital (Mitutoyo Digimatic Caliper, Mitutoyo Sul Americana Ltda). Os resultados foram avaliados de forma descritiva e de acordo com a legislação (BRASIL, 2007).

Resultados e Discussão

A IN46 determina que o iogurte deve ter contagem de bactérias lácticas viáveis de no mínimo 107 UFC/mL durante seu período de validade (BRASIL, 2007). Portanto, observou-se que apenas a amostra referente ao lote 2 da marca

B teve contagem em conformidade com legislação brasileira, enquanto as demais amostras apresentaram desconformidade. Portanto, 95% das amostras estavam em desconformidade com a legislação quanto à contagem de bactérias lácticas. As bactérias ácido lácticas do iogurte agregam vantagens para a saúde do consumidor, além de manter características sensoriais e nutricionais do produto (SAAD, 2006).

Tabela 1. Contagem de bactérias ácido lácticas (UFC/mL) de iogurtes brasileiros comercializados em Viçosa (MG)

Marcas	Lotes (UFC/mL)				
	1	2	3	4	5
A	<105	<105	<105	105	<105
B	3 x 10 ⁶	107	1,4 x 10 ⁶	8 x 10 ⁵	9 x 10 ⁵
C	<105	<105	<105	<105	<105
D	1,8 x 10 ⁶	3 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁶	<6 x 10 ⁵	<10 ⁶

A grande variação na contagem de bactérias ácido lácticas entre os lotes de uma mesma marca pode ser explicada por falhas no monitoramento de pontos críticos de controle no processo de fabricação, durante a estocagem na indústria ou no transporte e no comércio. As baixas contagens demonstram que os produtos não promovem efeitos benéficos aos consumidores (ARAÚJO et al., 2009). No presente estudo, a temperatura de estocagem pode ter influenciado a sobrevivência dos microrganismos ácido lácticos em alguns produtos, mesmo a contagem de bactérias ácido lácticas estando em conformidade com a legislação para uma das amostras.

Portanto, a forma de prevenir essa redução na quantidade de bactérias ácido lácticas no produto final é realizar uma efetiva fiscalização e inspeção dos produtos, bem como avaliar a temperatura de estocagem e armazenamento, conscientizar os proprietários da importância da temperatura ideal para estocagem, monitorar os pontos críticos de controle no processo de fabricação,

na indústria e no transporte dos produtos, além de controlar de forma eficiente a assepsia dos equipamentos.

Não foi observada atividade antagonista das bactérias ácido lácticas dos produtos avaliados frente as bactérias indicadoras *Salmonella* entérica subsp. *Typhimurium* ATCC 13076, *S. aureus* ATCC 29313, *E. coli* ATCC 25922 e a bactéria ácido láctica isolada de um dos iogurtes. Entretanto, a inibição do crescimento de bactérias patogênicas é uma propriedade desejável para seleção de linhagens probióticas de bactérias ácido lácticas (CUNHA *et al.*, 2013).

Ao avaliarem a atividade antagonista de estipes de bactérias ácido lácticas isoladas de derivados lácteos foi demonstrada pela literatura por meio da formação de halos de inibição contra estipes de *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*. Tais halos se dão pela difusão de substâncias a antagonistas produzidas pelas culturas lácticas. As atividades inibitórias verificadas foram justificadas pela difusão de substâncias inibidoras no ágar que impediram o crescimento das culturas patogênicas indicadoras (GUEDES NETO *et al.*, 2006; ARAÚJO *et al.*, 2009; CUNHA *et al.*, 2013). Portanto, no presente estudo, as bactérias podem não ter produzido tais substâncias, não sendo consideradas probióticas.

A diversidade de resultados encontrados na literatura e a falta de atividade antagonista no presente estudo também pode ser explicada pela existência de fatores que interferem diretamente na capacidade antagônica como o estágio de contaminação das placas com bactéria patogênica, a dose do inócuo contaminante, o tipo de cepa indicadora, a ácido resistência, a composição do meio, a quantidade e o tipo de bactéria ácido láctica utilizada. Além disso, convém ressaltar que para que ocorra a inibição do crescimento bacteriano, um conjunto de fatores intrínsecos e extrínsecos são determinados pela estabilidade microbiológica e o prazo comercial do produto, o que consiste no denominado conceito de obstáculos tecnológicos (ALEXANDRE *et al.*, 2002).

Conclusões

Iogurtes brasileiros não apresentam quantidade mínima satisfatória de bactérias ácido lácticas e estas não apresentam atividade antagonista frente à bactérias patogênicas. Indústrias e estabelecimentos comerciais devem ter controle durante o processamento e armazenamento de iogurtes, a fim de garantir a qualidade do produto ao consumidor.

Referências Bibliográficas

ALEXANDRE, D.P.; SILVA, M.R.; SOUZA, M.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo de minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.54, n.4, 2002.

ARAÚJO, M.M.P.; CUNHA, A.F.; LAGE, A.D.; COUTO, C.N.B.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; SOUZA, M.R. Enumeração de *Lactobacillus* spp em leites fermentados probióticos comercializados em Belo Horizonte e Luz. In: XVI ENCONTRO NACIONAL E II CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, Belo Horizonte, 2009, Anais... Belo Horizonte, 2009.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Diário Oficial da União, Brasília, seção 1, p.5, 24 de outubro de 2007.

CUNHA, A.F.; ACURCIO, L.B.; ASSIS, B.S.; OLIVEIRA, D.L.S.; LEITE, M.O.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; SOUZA, M.R. In vitro probiotic potential of *Lactobacillus* spp. isolated from fermented milks. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.65, n.6, p.1876-1882, 2013.

GUEDES NETO, L.G.; SOUZA, M.R.; NUNES, A.C.; NICOLI, J.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijo de coalho artesanal e industrial frente a micro-organismos indicadores. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.57, n.2, p.245-250, 2005.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.42, p.1-16, 2006.

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of Gram positive bacteria. Bacteriological Reviews, v.40, p.722-756, 1976.