

CAPÍTULO 5

AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE PROBIÓTICOS EM LEITES FERMENTADOS COMERCIALIZADOS

Data de submissão: 18/03/2024

Data de aceite: 01/04/2024

Rafaela Garcia de Oliveira

Acadêmica de Medicina Veterinária da
Universidade Professor Edson Antônio
Velano (Unifenas)
Alfenas, MG
<http://lattes.cnpq.br/2812880137058607>

Gustavo Lucas Costa Valente

Professor do curso de Medicina
Veterinária da Universidade Professor
Edson Antônio Velano (Unifenas)
Alfenas, MG
<http://lattes.cnpq.br/6940359301313793>

Isabella Carneiro Motta

Acadêmica de Medicina Veterinária da
Universidade Professor Edson Antônio
Velano (Unifenas)
Alfenas, MG
<http://lattes.cnpq.br/2239461005404356>

RESUMO: O objetivo deste trabalho consiste em avaliar quantitativamente e qualitativamente os probióticos presentes em leite fermentados de uso comercial. Os leites fermentados comerciais identificados como LC16 e LC40 foram submetidos a contagem microbiana, determinação da acidez titulável e teste de perfil de sensibilidade a antimicrobianos

(antibiograma). A concentração de probióticos e a acidez titulável das amostras analisadas estavam em conformidade aos parâmetros determinados pela Instrução Normativa nº 46 de 2007, que aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. O antibiograma revelou padrões de resistência nos probióticos em relação a determinados agentes antimicrobianos testados. Este achado sugere a possibilidade de transmissão de genes plasmidiais de resistência a outras bactérias, representando um potencial perigo epidemiológico. São necessárias investigações adicionais para validar a extensão desse risco e avaliar o impacto da resistência dos probióticos aos antimicrobianos na segurança dos consumidores.

PALAVRAS-CHAVE: saúde; probióticos; fermentação; contagem de colônia microbiana, teste de sensibilidade microbiana.

QUANTITATIVE AND QUALITATIVE EVALUATION OF PROBIOTICS IN COMMERCIAL FERMENTED MILKS

ABSTRACT: The aim of this study is to quantitatively and qualitatively evaluate the probiotics present in commercially available fermented milk. Commercial fermented milks identified as LC16 and LC40 were subjected to microbial count, determination of titratable acidity, and antimicrobial sensitivity profile testing (antibiogram). The concentration of probiotics and titratable acidity of the samples analyzed were in accordance with the parameters determined by Normative Instruction No. 46 of 2007, which approves the Technical Regulation of Identity and Quality of Fermented Milks. The antibiogram revealed resistance patterns in the probiotics in relation to certain tested antimicrobial agents. This finding suggests the potential for transmission of plasmid-mediated resistance genes to other bacteria, representing a potential epidemiological hazard. Further investigations are necessary to validate the extent of this risk and assess the impact of probiotic resistance to antimicrobials on consumer safety.

KEYWORDS: health; probiotics; fermentation; colony count, microbial; microbial sensitivity tests.

INTRODUÇÃO

Ao decorrer dos anos, houve um aumento na demanda de pesquisas em prol da saúde, com o intuito de prevenir as fontes originárias de doenças. A nutrição se mostrou fator determinante da higidez, sendo cada vez mais importante a realização de estudos com o objetivo de suprir as deficiências nutricionais corporais, e suas devidas particularidades. A alimentação adequada é capaz de promover efeitos benéficos, como prevenção de doenças e aumento da imunidade e do metabolismo, enquanto o consumo não balanceado pode resultar em sua própria deterioração.

Com isso, na tentativa de acompanhar os novos estudos e atualizações, o mercado tende a criar novas formas estratégicas de balancear o consumo e revolucionar o sistema. Sendo assim, a criação de produtos saudáveis, porém com praticidade e acessibilidade, são cada vez mais ofertados.

O consumo de alimentos lácteos fermentados, especificamente os leites fermentados, é uma fonte eficaz de vitaminas, minerais, probióticos, prebióticos, proteínas e antioxidantes, criando assim produtos de maior valor e crescimento comercial (SAAD, 2006). O consumo de probióticos está diretamente ligado ao controle da microbiota intestinal e à prevenção de doenças gastrointestinais, como a síndrome do intestino irritável, doença de Crohn, câncer de cólon, diarreias associadas ao uso de antimicrobianos e/ou a doenças infecciosas, intolerância à lactose, além de auxiliar no controle do colesterol e aumentar a imunidade (LEBLANC e PERDIGÓN, 2005).

Probióticos são micro-organismos vivos, que quando administrados em concentrações adequadas promovem benefícios à saúde do hospedeiro (Organização Mundial de Saúde, 2023). Para um microrganismo ser considerado probiótico é necessário comprovar os seus benefícios à saúde na concentração referida. São inúmeros os

suplementos e alimentos comercializados como veículos de probióticos no varejo. No entanto, diversos fatores podem interferir na viabilidade desses microrganismos, como a temperatura de armazenamento desses produtos.

Em geral, para que os probióticos consigam exercer seus efeitos funcionais, é necessário que sua concentração no sítio (intestino) seja de no mínimo 6 log UFC/g. Para tal, o alimento deve apresentar uma contagem mais elevada, acima de 9 log UFC/g, uma vez que espera-se que haja perda da viabilidade celular ao longo do trato gastrintestinal, por efeito do ácido clorídrico gástrico e da hidrólise exercida por sais biliares. Alguns produtos podem não conter a concentração exigida pela legislação, seja por falhas tecnológicas de produção, ou por acondicionamento inadequado dos produtos no varejo.

A análise de leites fermentados inclui também a determinação da acidez no leite, já que este é um indicador da conservação do mesmo, servindo como controle de qualidade (GARSKE, 2018). É importante comprovar, com o antibiograma, a ausência de qualquer determinante de resistência antimicrobiana, para evitar sua propagação lateral.

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo realizar uma análise quantitativa e qualitativa de probióticos presentes em leites fermentados comerciais. Esta análise inclui a contagem microbiana, o perfil de resistência a antimicrobianos e a acidez titulável.

METODOLOGIA

Obtenção de materiais

Foram adquiridos dois tipos de leites fermentados (identificados como LC16 e LC40) pela cepa *Lactobacillus casei* Shirota em estabelecimento varejista de Alfenas-MG. O trabalho foi realizado em três repetições, portanto, para cada tratamento, foi feita a aquisição de produtos oriundos de três lotes diferentes.

Contagem microbiana

Para determinar a quantidade de microrganismos em cada amostra, realizou-se o plaqueamento de diluições do produto pela técnica de *pour plate*. Para realização da diluição 10¹ de cada amostra, 25 g dos leites fermentados foram pesados em *erlenmeyers* contendo 225 mL de salina peptonada (0,85% de cloreto de sódio (Lab. Confiança) e 0,1% de peptona bacteriológica (K25-1616, Kasvi)). As demais diluições foram feitas transferindo 1 mL da diluição anterior para tubos contendo 9 mL de salina peptonada (MAITAN, 2013).

Na sequência, alíquotas de diluições selecionadas foram transferidas para placas de Petri, que na sequência foram adicionadas de ágar de Man, Rogosa e Sharpe- MRS (Acumedia). Após solidificação do meio, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas para crescimento das colônias.

O cálculo do número de bactérias por amostra foi realizado utilizando a seguinte equação, contabilizando apenas as placas que apresentaram entre 25 e 250 colônias:

$$UFC/g = \frac{n^{\circ} de\ colônias}{diluição\ da\ amostra}$$

Resistência a antimicrobianos

As amostras de *L. casei* Shirota foram cultivadas em caldo MRS (Acumedia) a 37°C, por 24 h sob aerobiose. Em seguida, os microrganismos foram coletados por alças de transferência e estriados em placas de Petri contendo ágar MRS. Após incubação a 37°C durante 24h, as colônias foram transferidas, com auxílio de alças estéreis, para tubos de ensaio contendo 3,5mL de solução salina (0,85% de cloreto de sódio) até que a turvação atingisse 0,5 na escala de solução nefelométrica McFarland, o que equivale a uma concentração aproximada de 10^8 UFC/mL. A partir do uso de *swabs* estéreis, a salina foi coletada e distribuída na superfície de placas contendo ágar MRS, Mueller-Hinton – MH (Acumedia) e *Plate Count* - PCA (K25-1056, Kasvi).

Na sequência, foram distribuídos discos contendo doses conhecidas de antimicrobianos sobre o ágar MRS de cada placa: Ampicilina 10 μ g, Cefoxitina 30 μ g, Ceftriaxona 30 μ g, Ciprofloxacina 5 μ g, Cloranfenicol 30 μ g, Estreptomicina 10 μ g, Gentamicina 10 μ g, Penicilina 10 μ g, Tetraciclina 30 μ g, Vancomicina 30 μ g. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Os halos de inibição formados ao redor dos discos de antimicrobianos foram medidos com auxílio de um paquímetro digital (Fowler).

Por fim, foram classificadas as amostras devido seu perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, como resistentes, moderadamente sensíveis ou sensíveis, segundo o proposto por Charteris et al. (1998).

Análise estatística

Os parâmetros contagem de probióticos (após transformação logarítmica) e acidez titulável dos leites fermentados LC16 e LC40 foram comparados por meio de realização de análise de variância (ANOVA), utilizando o software Graphpad Prism 9.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da contagem bacteriana e da acidez titulável dos leites fermentados analisados estão dispostos na tabela 1.

Parâmetro	Leite fermentado	
	LC16	LC40
Contagem bacteriana (log UFC/g)	10,52 ± 0,32	10,94 ± 0,33
Acidez titulável (g ácido láctico/100 mL)	1,12 ± 0,02	1,23 ± 0,11

Tabela 1. Média e desvio padrão da contagem bacteriana (log UFC/mL) e acidez titulável (g de ácido láctico/100 mL) dos leites fermentados convencional (LFC) e 40 (LF40).

A análise de variância (ANOVA) das médias das contagens bacterianas indicou que não houve diferença significativa entre as médias obtidas entre os produtos LC16 e LC40. Além disso, ambos os produtos estão de acordo com a legislação, seguindo a Instrução Normativa N° 46, quanto à quantidade de bactérias lácticas em leite cultivado, com valor mínimo de 6 log UFC/mL (Brasil, 2007).

Ambos os leites fermentados atendem a quantidade mínima estabelecida pelo fabricante: LC16 (10,20 log UFC/g) e LC40 (10,60 log UFC/g), segundo o website da marca Yakult. Os valores ligeiramente elevados em comparação ao informado pelo fabricante podem ser explicados pelo efeito de pós-fermentação, que consiste no crescimento das bactérias durante o armazenamento e distribuição do produto ao varejo.

Outrossim, a ANOVA também indicou que não há diferença significativa entre as médias obtidas para acidez titulável (g de ácido láctico/100 mL). Os dois produtos apresentaram valores de acordo com a legislação, seguindo a Instrução Normativa N° 46 (Brasil, 2007), quanto à acidez titulável em leite cultivado, com valores aceitáveis entre 0,6 e 2,0 g de ácido láctico/100 mL. O ácido láctico é o principal produto da fermentação do leite, que ocorre devido à presença de bactérias, a partir da conversão da lactose em ácido láctico.

Os resultados do teste de antibiograma estão dispostos na tabela 2.

Antimicrobiano	Concentração	Meio de cultura		
		MRS	MH	PCA
Cloranfenicol	30 µg	S	S	S
Estreptomicina	10 µg	R	MS	S
Gentamicina	10 µg	R	S	S
Penicilina	10 µg	S	MS	R
Tetraciclina	30 µg	S	S	S
Ampicilina	10 µg	S	S	S
Cefoxitina	30 µg	S	R	R
Ceftriaxona	30 µg	R	R	R
Ciprofloxacina	30 µg	MS	R	S
Vancomicina	30 µg	R	R	R

R= resistente, S= sensível e MS= moderadamente sensível.

Tabela 2. Perfil de sensibilidade de *Lactobacillus casei* Shirota a antimicrobianos em diferentes meios de cultura

O MRS é um meio de cultura próprio para crescimento de lactobacilos, e por isso, é possível analisar a bactéria expressando o mais próximo possível do potencial do seu metabolismo.

O antibiograma é apenas uma avaliação fenotípica, ou seja, morfológica. Para verificar os reais riscos da resistência antimicrobiana no consumo dos produtos citados nesta pesquisa, são necessárias mais pesquisas, realizando avaliações genotípicas.

CONCLUSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar a quantidade e qualidade dos probióticos disponíveis em produtos lácteos fermentados ofertados para o consumo humano e que asseguram uma alta quantidade de *Lactobacillus casei* Shirota em seu interior.

Para obtenção destes resultados, foi realizada contagem microbiana e perfil de sensibilidade dos probióticos frente a alguns antimicrobianos selecionados. A análise quantitativa de lactobacilos vivos nos produtos lácteos Yakult e Yakult 40 obteve resultados satisfatórios, garantindo um melhor funcionamento intestinal e prevenção de inúmeras doenças, citadas neste estudo. A acidez titulável de ambos os produtos obteve resultados igualmente satisfatórios e dentro dos números adequados para o consumo.

O antibiograma foi cultivado em placas de petri em três tipos diferentes de meios de cultura, sendo destes o principal o MRS. O caldo MRS é baseado na formulação de DeMan, Rogosa e Sharpe e é um meio não seletivo para o crescimento abundante de lactobacilos. Por este motivo, foi o meio de cultura escolhido para análise de perfil de sensibilidade. A escolha do meio de cultura pode alterar os resultados, já que as bactérias têm afinidades diferentes em cada meio.

As resistências apresentadas por alguns tipos de antimicrobianos precisam ser avaliadas. A vancomicina é um antimicrobiano que apresenta altos índices de resistência, citados em diversos estudos, onde as bactérias ácido lácticas podem atingir até 100% de resistência a este antibiótico. Porém, por ser uma resistência intrínseca, ou seja, uma característica fenotípica do organismo, não traz riscos ao consumidor, já que não é capaz de transferir genes de resistência a outras bactérias.

A causa da resistência da estreptomicina e gentamicina se deve a mecanismos relacionados à permeabilidade de membranas e ausência de citocromos. Portanto, estes fármacos podem transferir genes de resistência a outros microrganismos. Estudos sobre a resistência à ceftriaxona demonstraram que o perfil de sensibilidade ainda é muito variável.

A conclusão deste estudo é de que o consumo dos produtos Yakult e Yakult 40 promove inúmeros benefícios para o consumidor, porém, deve-se atentar a possibilidade de transferência de resistência para os microrganismos do organismo do consumidor.

REFERÊNCIAS

CHARTERIS, W. P; et al. **Antibiotic susceptibility of potentially probiotic Lactobacillus species.** PubMed, 1998.

Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia. World Gastroenterology Organization, 2023.

GARSKE, Raquel Pischke. **Determinação rápida e direta de acidez de alimentos semi-sólidos através de entalpimetria no infravermelho.** Porto Alegre, 2018.

LEBLANC, Alejandra; et al. **Effects of milk fermented by Lactobacillus helveticus R389 on immune cells associated to mammary glands in normal and a breast cancer model.** PubMed, 2005.

MAITAN, Valeria Ribeiro. **Quantificação de Microrganismos: Diluição e Plaqueamento “Spread Plate” e “Pour Plate”.** PUC Goiás, 2013.

SAAD, Susana Marta Isay. **Probióticos e prebióticos: o estado da arte.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2006.