

VIABILIDADE DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS EM LEITES FERMENTADOS COMERCIAIS

Viability of probiotic lactic bacteria in commercial fermented milks

Resumo:

O presente estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade de bactérias lácticas probióticas em três leites fermentados comerciais a fim de se certificar que os mesmos continham a quantidade mínima desses microrganismos informadas em seus rótulos e/ou exigida na legislação brasileira. Para isso, foi realizada a contagem de bactérias lácticas totais em placas, utilizando-se o ágar MRS. Ainda, foram determinados pH e acidez. Todas as amostras continham bactérias lácticas em números acima de 10^7 ufc/mL, estando adequadas quanto aos requisitos avaliados. A acidez das amostras variou de 1,0% a 1,57% de ácido láctico, estando todas de acordo com as exigências da legislação. Com relação ao pH, os valores observados variaram de 3,5 a 4,0, intervalo considerado adequado para esse tipo de produto, e com valores próximos dos relatados por outros autores. Portanto, números adequados de bactérias probióticas viáveis foram mantidos durante todo o tempo de estocagem refrigerada dos produtos pesquisados.

Abstract:

The present research had as aim to evaluate the viability of probiotic lactic bacteria in three commercial fermented milks in order to make sure that they contained the minimum amount of these microorganisms reported in their labels and / or required by Brazilian legislation. For this, total lactic acid bacteria were counted in plates using MRS agar. Also, pH and acidity were determined. All samples contained lactic acid bacteria in numbers above 10^7 cfu / mL being adequate with respect to the evaluated requirements. The acidity of the samples ranged from 1.0% to 1.57% of lactic acid, all being in accordance with the legislation. In relation to the pH, the observed values ranged from 3.50 to 4.40, interval considered adequate for this type of product, and with values close to those reported by others authors. Therefore, numbers of viable probiotic bacteria were kept during all refrigerated storage time of these products.



**Joellington Marinho Almeida,
Janne Morais, Genilson Batista
Oliveira, Géssica Alexandre
Barros, Janeeyre Ferreira Maciel**

¹Universidade Federal da Paraíba. E-mail:
joellingtonalmeida@gmail.com

Contato principal
Joellington Marinho Almeida ¹



Palavras chave: Acidez, Produto lácteo,
Legislação.

Keywords: Acidity, Dairy product, Legislation.



INTRODUÇÃO

Os leites fermentados são produtos obtidos mediante a ação de cultivos de microrganismos específicos, que podem incluir *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp.*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e/ou outras bactérias lácticas que por sua atividade contribuam para a determinação das características do produto final (BRASIL, 2008). Algumas dessas bactérias podem ser classificadas como probióticas, por serem capazes de conferir benefícios a saúde que incluem o alívio dos sintomas da intolerância à lactose, modulação do sistema imune e da microbiota intestinal, efeito hipocolesterolêmico e ação anticarcinogênica, entre outros (ANTUNES et al., 2007; SHAH, 2007; MAZOCHI et al., 2010; ROWLAND et al. 2010; MELO, et al. 2016).

Para que esses benefícios sejam assegurados, as bactérias probióticas deverão ser ingeridas regularmente, em quantidades adequadas (VINDEROLA; REINHEIMER, 2003; ZUCCOTTI et al., 2008; ROWLAND et al., 2010). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA, essa quantidade deve ser informada pelo fabricante, no rótulo do produto, juntamente com a ação alegada, devendo ser mantida durante todo o seu prazo de validade (BRASIL, 2008). Entretanto, alguns fatores tais como acidez, temperatura e tempo de estocagem podem afetar a viabilidade dessas bactérias, fazendo com que os produtos não atendam ao estabelecido no rótulo (BURITI e SAAD, 2007; LAGO, 2009; MAZIERO, et al. 2011; GUTIERREZ, et al. 2012). Por essa razão, faz-se necessário o monitoramento frequente desses alimentos de modo a assegurar ao consumidor de que as informações fornecidas em seus rótulos estejam sendo atendidas.

Nesse estudo, a viabilidade de bactérias lácticas foi avaliada na metade e no final do prazo de validade de leites fermentados comerciais a fim de se certificar que os mesmos continham o número mínimo alegado em seus rótulos e/ou estabelecidos na legislação brasileira.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta das amostras

Amostras de três leites fermentados desnatados adoçados comerciais (A, B e C) de diferentes lotes, foram adquiridas em supermercados de João Pessoa-PB, no período de abril a agosto 2017 e transportadas, em caixas isotérmicas contendo gelo, até o laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba-UFPB, sendo mantidas sob refrigeração a 5°C até o momento das análises. No total, foram realizadas cinco coletas, sendo obtida uma amostra de cada produto, por coleta. Cada amostra consistiu de um conjunto contendo 6 frascos, com 75-80 g de produto. Com base nas informações dos rótulos, dois produtos alegaram conter probióticos, tendo o produto A informado a quantidade mínima de 1010 unidades formadoras de colônias por

unidade (ufc/unidade) e o produto B de 108 unidades formadoras de colônias por unidade (ufc/unidade). Todas as amostras foram submetidas à contagem total de bactérias lácticas e as análises de potencial hidrogeniônico (pH) e acidez.

Determinação de potencial hidrogeniônico (pH) e acidez

O potencial hidrogeniônico (pH) foi determinado utilizando-se potenciômetro previamente calibrado, introduzindo-se o eletrodo diretamente em cerca de 50 mL da amostra homogeneizada em um béquer de 100 mL. A acidez foi obtida por titulação de alíquotas de 10 g de amostras de leite fermentado homogeneizadas em 10 mL de água destilada, com solução de hidróxido de sódio N/9 (Normal/9), em presença do indicador fenolftaleína, sendo os resultados expressos em g de ácido láctico/100 g (BRASIL, 2006).

Contagem de bactérias lácticas totais

Amostras foram submetidas às diluições decimais seriadas, utilizando água peptonada 0,1%, tendo sido selecionadas as diluições de 10⁻⁴ a 10⁻⁹ para serem submetidas a contagem em placas, pela técnica de semeadura em profundidade. O meio de cultura utilizado foi o ágar de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) e as placas foram semeadas em duplicata, por diluição. Após solidificação do meio, foi acrescentada sobre este uma camada de cobertura contendo o mesmo meio, a fim de criar uma atmosfera microaeróbia. As placas foram incubadas a 37°C, por 48-72 horas. Após incubação, fez-se a contagem das colônias, sendo isolados todos os diferentes tipos que ocorreram nas placas, para serem submetidas à coloração de Gram e ao teste de catalase (APHA, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação de pH e acidez dos leites fermentados

Os resultados das análises de pH e acidez dos três leites fermentados pesquisados estão descritos na Tabela 1.

Os valores de pH das amostras variaram de 3,5 a 4,0, estando todos situados dentro do intervalo considerado satisfatório para alimentos veículos de bactérias probióticas. Segundo Charalampopoulos et al. (2003), alimentos com pH na faixa de 3,5 a 4,5 e com alta capacidade tamponante tais como leite e produtos lácteos irão contribuir para o aumento no pH do estômago, favorecendo a maior sobrevivência das bactérias probióticas nesse ambiente. Em outros estudos sobre pH de leites fermentados também foram encontrados valores dentro desse intervalo, variando de 3,6 a 4,4 (GRANATO, 2008; LAGO, 2009; MAZIERO, et al. 2011).

Quanto à acidez, os valores observados situaram-se entre 1,00% - 1,57% de ácido láctico. De acordo com a

legislação brasileira, os limites estabelecidos são mínimo de 0,6 e máximo de 2% de ácido láctico (BRASIL, 2008). Com base nesses padrões, todas as amostras analisadas estavam com acidez adequada. Os resultados de outras pesquisas também demonstraram adequação na acidez de

leites fermentados (FARIAS et. al. 2012; GUTIERREZ et. al., 2012), tendo sido encontrado somente um estudo, conduzido por Castilho et. al. (2013), que obteve amostras fora do padrão, com valores abaixo de 0,6% de ácido láctico.

Tabela 1 Resultados das análises de pH e acidez das três amostras de leites fermentados comercializados em João Pessoa-PB

Repetição	Produto A				Produto B				Produto C			
	pH		Acidez		pH		Acidez		pH		Acidez	
	1/2	Fim	1/2	Final	1/2	Final	1/2	Final	1/2	Final	1/2	Final
R1	3,60	3,60	1,02	1,13	3,90	3,90	1,34	1,35	3,6	3,5	1,10	1,10
R2	3,60	3,50	1,09	1,57	3,90	3,80	1,25	1,38	3,8	3,5	1,14	1,16
R3	3,80	3,60	1,08	1,09	3,90	3,80	1,25	1,29	3,5	3,5	1,00	1,05
R4	3,50	3,50	1,12	1,20	4,00	3,90	1,15	1,20	3,7	3,6	1,14	1,18
R5	3,50	3,50	1,10	1,20	4,00	3,90	1,20	1,25	3,8	3,7	1,19	1,30
Média	3,60	3,54	1,06	1,17	3,94	3,86	1,24	1,29	3,7	3,6	1,10	1,20
Desvio	0,12	0,05	0,04	0,23	0,05	0,05	0,07	0,07	0,14	0,09	0,09	0,09

Contagem total de bactérias lácticas probióticas nos leites fermentados

Os resultados das contagens de bactérias lácticas probióticas nos três leites fermentados avaliados estão descritos na Tabela 2.

Todos os produtos analisados apresentaram contagens de bactérias lácticas probióticas acima de 107 ufc/mL, atendendo, portanto, a exigência da legislação (106 ufc/mL de produto) (BRASIL, 2007). Com relação às quantidades mínimas alegadas nos rótulos, os produtos A e B cumpriram esse requisito na totalidade de suas amostras, tendo o produto A alcançado a quantidade

mínima de 2,7x10⁸ ufc/mL (Tabela 2), correspondente a 2,2x10¹⁰ ufc/80 g de produto e o produto B obtido 8,2x10⁷ ufc/mL (Tabela 2), correspondente a 6,2x10⁹ ufc/75 g de produto. Quanto ao produto C, contagens elevadas também foram observadas, acima de 107 ufc/mL, (Tabela 2). Esse produto também foi adicionado de uma bactéria probiótica, porém não tinha nenhuma alegação em seu rótulo, nem informação quanto a quantidade mínima disponível por unidade do produto. Com base nesses resultados, os prazos de validade adotados pelos fabricantes podem ser considerados satisfatórios, garantindo a manutenção de números adequados de bactérias probióticas viáveis durante todo o tempo de estocagem refrigerada dos produtos.

Tabela 1 Resultado da contagem total de bactérias lácticas em três leites fermentados comercializados em João Pessoa-PB.

Repetição	Produto A		Produto B		Produto C	
	1/2	Fim	1/2	Fim	1/2	Fim
1	4,9 x 10 ⁹	3,4 x 10 ⁹	1,1 x 10 ⁸	8,2 x 10 ⁷	1,3 x 10 ⁸	2,5 x 10 ⁷
2	2,5 x 10 ⁹	2,7 x 10 ⁸	6,4 x 10 ⁸	1,2 x 10 ⁸	6,1 x 10 ⁷	1,6 x 10 ⁷
3	1,1 x 10 ⁹	6,7 x 10 ⁸	1,3 x 10 ⁸	1,0x10 ⁸	1,2 x 10 ⁸	4,8 x 10 ⁷
4	1,0 x 10 ¹⁰	5,8 x 10 ⁹	5,9x10 ⁸	2,0x10 ⁸	1,6 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁸
5	8,5 x 10 ⁹	9,0 x 10 ⁸	3,5x10 ⁸	1,6x10 ⁸	7,3 x 10 ⁷	4,5 x 10 ⁷

Em outros estudos sobre viabilidade de bactérias lácticas em leites fermentados comerciais, os resultados encontrados também demonstraram adequação dos produtos quanto a esse requisito. Segundo Lago (2009), leites fermentados com até 60 dias de validade continham bactérias lácticas na ordem de 107 ufc/mL ou mais, mesmo no final de seu prazo de validade. Barreto et. al. (2003) também verificaram boa viabilidade das bactérias lácticas em leites fermentados no final de seu prazo de validade (até 60 dias).

Entretanto, Castilho et. al. (2013) verificaram que 3 das 5 marcas de leites fermentados comercializadas em Viçosa-MG apresentavam amostras com contagens de bactérias lácticas abaixo do mínimo exigido na legislação (106

UFC/mL). Esses autores foram os únicos que utilizaram incubação aeróbica para as bactérias lácticas, condição que dificulta o desenvolvimento desses microrganismos, enquanto os demais autores citados usaram plaqueamento em profundidade, com incubação em condições microaerofílicas ou incubação em jarra de anaerobiose.

CONCLUSÃO

Os três leites fermentados analisados nessa pesquisa continham números de bactérias lácticas em conformidade com as alegações de seus rótulos e/ou com o exigido na legislação brasileira em vigor, além de estarem adequados quanto aos valores de acidez observados. Portanto, os prazos de validade estabelecidos pelos fabricantes

possibilitaram a manutenção de elevados números de bactérias probióticas viáveis nos leites fermentados durante todo seu tempo de estocagem refrigerada, condição essencial para assegurar os benefícios à saúde propostos com o consumo desses produtos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION.

Compendium of methods for the microbiological examination of food, 4. ed. Washington: **APHA**, 2001.

ANTUNES, A. E. C.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; DOURADO, F. M.; RODRIGUES, L. G.; LARAYER, A. L. S. Desenvolvimento de buttermilk probiótico. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n.1, p. 83-90, 2007.

BARRETO, G. P. M.; SILVA, N.; SILVA, E. N.; Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobactérias e Bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.1, p.119 -126. 2003.

BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*. **Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición**. Vol. 57 N° 4, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos, **Apresenta as alegações de propriedades funcionais aprovadas pela ANVISA** Atualizado em julho 2008.

CHARALAMPOPOULOS, D.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C. Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. **International Journal of Food Microbiology** 82. 133 – 141. 2003.

CASTILHO, N. P. A.; CUNHA, A. F.; ARAÚJO, M. M. P. qualidade de leites fermentados brasileiros e atividade antagonista in vitro de suas bactérias ácido lácticas. **B. Ceppa**, v.31, n.2, p.207-214, 2013.

FARIAS, M. M. A. G.; OZELAME, S. B.; SCHIMITT, B. H. E.; CAPRISTANO, D. F.; SILVEIRA, E. G. Avaliação da Acidez de Diversas Marcas de Leite Fermentado Disponíveis Comercialmente. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, João Pessoa, vol. 12, núm. 4, pp. 451-455. out./dez., 2012.

GRANATO, D. Parâmetros físico-químicos de leites fermentados com bactérias probióticas comercializados em Curitiba (PR). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, n. 361, v.63, p. 39-46, 2008.

GUTIERREZ, E. M. R.; ZIBORDI, G.; SOUZA, M. C. Avaliação Físico-Química e Sensorial de Leites Fermentados Probióticos. *Rev. Inst. Latic.* “Cândido Tostes”, Jan/Fev, n° 384, 67: 22-29, 2012.

LAGO, A. M. S. Avaliação do padrão de identidade e qualidade de leites fermentados probióticos. Dissertação. **Universidade Federal da Bahia**, 2009. 76p.

MAZOCHI, V.; JÚNIOR, F. E. M.; VAL, C. H.; DINIZ, D. N.; RESENDE, A. F.; NICOLI, J. R.; SILVA, A. M. Iogurte probiótico produzido com leite de cabra suplementado com *Bifidobacterium* spp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 6, p. 1484-1490, 2010.

MAZIERO, M. T.; TOLENTINO, M. C.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades sensoriais e físico-químicas de leites fermentados comerciais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.5, n.1, p.274-281, 2011.

MELO, T. A.; RIBEIRO-ALVES, M. A.; LAVINAS, F. C.; RODRIGUES, I. A. Levantamento e caracterização dos produtos probióticos disponíveis no mercado varejista da região metropolitana do Rio de Janeiro. **Revista Rede de Cuidados em Saúde**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2016.

ROWLAND, I. R.; CAPRUSO, L.; COLLINS, K.; CUMMINGS, J.; DELZENNE, N.; GOULET, O.; MEIER, R. Current level of consensus on probiotic science-Report of an expert meeting- London, 23 November 2009, *Gut Microbes* 1:6, 436-439; **Landes Bioscience**; November/December 2010.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **J Dairy Sci**; 83(4):894-907. 2007.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Lactic acid starter and probiotic bacteria a comparative “in vivo” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, Essex, v. 36, n.9, p. 895-904, 2003.

ZUCCOTI, G. V.; MENEGHIN, F.; RAIMONDI, C.; DILILLO, D.; AGOSTONI, C.; RIVA, E.; GIOVANNINI, M. Probiotics in clinical practice: an overview. **Journal of International Medical Research**, Northampton, v. 36, n.1, p.1-53, 2008.