

**Estudo da relação entre atividade antioxidante e contagem de bactérias lácticas em iogurtes de frutas e leites fermentados comercializados em Santos-SP**

**Autora: Loren Duarte Martinez**

**Orientadora: Anna Rafaela Cavalcante Braga**

**RESUMO**

Os benefícios de probióticos e o potencial antioxidante dos alimentos estão amplamente descritos em literatura, e na medida em que o consumidor se apropria destes benefícios, aumenta-se a procura dos mesmos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi quantificar as bactérias lácticas presentes em produtos lácteos fermentados e também analisar a atividade antioxidante desses produtos na busca por relação estatística entre os dois valores. Foram adquiridos produtos próximos da validade com alegações funcionais no rótulo que eram comercializados em Santos-SP e os mesmos foram submetidos à contagem de bactérias lácticas e, adicionalmente, à determinação da atividade antioxidante, além de medida do pH. As análises foram executadas em triplicata e para detectar diferença estatística foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida de Tukey ( $p < 0,05$ ). As amostras analisadas tinham características sensoriais adequadas para o padrão de identidade e qualidade (PIQ) e a contagem de bactérias lácticas obteve valores de 3 produtos abaixo do esperado pela legislação vigente da ANVISA de 2008. Não foi possível detectar influência direta de variáveis na composição frente à ação antioxidante dos alimentos analisados e também não foi possível fazer uma associação entre a quantidade de bactérias lácticas e os valores de atividade antioxidante das amostras. Quanto ao pH dos produtos, os valores variaram de 4,05 a 5,09 e estes valores não demonstraram relação diretamente proporcional com a quantidade de bactérias lácticas viáveis nem com a atividade antioxidante.

**Palavras-chave: atividade antioxidante, produtos lácteos, contagem de bactérias.**

## 1. Introdução

De acordo com a RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002, probióticos são definidos como alimentos com propriedades funcionais e descritos como “*micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo*”. Estes estão presentes em alguns de nossos alimentos de consumo desde tempos antigos, como peixes, iogurte e diferentes tipos de queijos (AMARA, 2012 *apud* AMARA; SHIBL, 2015).

O uso dos probióticos têm sido sugeridos para tratamento e prevenção de diferentes problemas no trato gastrintestinal devido sua grande similaridade com os efeitos da microbiota normal do corpo humano (PEDROSO, 2011). E, conforme o consumidor toma conhecimento dos benefícios do seu consumo, a busca por estes alimentos aumenta consideravelmente (DALIRI; LEE, 2015).

Mas a atual mudança proposta pela ANVISA em 2016 sobre os critérios para alegação dos probióticos em produtos alimentícios muda o cenário, dificultando a comprovação dessa alegação funcional.

Em 2008 a ANVISA estabelecia a obrigatoriedade de que a quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) entre  $10^8$  e  $10^9$  UFC com a comprovação da eficácia realizada com base em laudos que demonstram essa quantidade mínima até o prazo de validade, bem como um teste de resistência da cultura na acidez gástrica e aos sais biliares.

No entanto, atualmente, para comprovação da segurança e eficácia do produto probióticos, outros critérios foram estabelecidos sendo as seguintes informações exigidas para que o produto seja considerado como probiótico: caracterização do micro-organismo; perfil de resistência a antimicrobianos e informações sobre a base genética da resistência antimicrobiana; determinação da atividade hemolítica para espécies com potencial hemolítico; estudos disponíveis na literatura que descrevem efeitos adversos observados com a cepa em questão; demonstração de eficácia além da viabilidade (quantidade mínima viável do micro-organismo para exercer a propriedade funcional no final do prazo de validade do produto e nas condições de uso, armazenamento e distribuição). A não apresentação de alguma das informações indicadas acima deve ser adequadamente justificada para avaliação da Anvisa. Informações adicionais podem ser solicitadas caso a Agência julgue necessário (ANVISA, 2016). Essas novas exigências põem em discussão o atendimento a esses requisitos em relação aos produtos que estão atualmente no mercado com essa alegação.

Alguns iogurtes probióticos que se encontram no mercado são adicionados de polpas de frutas, isso está relacionado com a preferência do consumidor bem como a presença de compostos bioativos nas polpas de frutas; o que traz além dos aspectos nutricionais, benefícios à saúde já descritos extensivamente na literatura especializada (ABE; LAJOLO & GENOVESE, 2012).

Os teores de compostos bioativos são relacionados com a atividade antioxidante dos alimentos e tal atividade é elevada em produtos contendo frutas ricas em compostos bioativos. O aporte de compostos bioativos é de fundamental importância frente as diversas funções biológicas desempenhadas por estes. Numerosos estudos epidemiológicos, conduzidos em muitos países indicam que uma dieta rica em frutas e vegetais, incluindo seus produtos, podem retardar os processos de envelhecimento e reduzir o risco no desenvolvimento de diversas doenças relacionadas ao estilo de vida, tais como cardiopatias, cânceres, bem como outras desordens, como artrite reumatóide, doenças estomacais, Parkinson e Alzheimer (ALMEIDA *et al.*, 2011).

A ação combinada de micro-organismos probióticos com alimentos ricos em polpa de frutas podem trazer efeitos benéficos sinérgicos ligados ao seu consumo. Portanto, considerando o acima exposto o objetivo do presente trabalho é avaliar se existe uma relação entre atividade antioxidante e a contagem de bactérias lácticas em iogurtes de frutas comercializados em Santos-SP.

## **2. Objetivo**

Analisar as bactérias lácticas presentes em produtos tipo lácteos fermentado comercializados na cidade de Santos-SP, além de avaliar a atividade antioxidante desses produtos a fim de relacionar estes dois parâmetros estatisticamente.

## **3. Metodologia**

### **3.1 Amostras**

Os produtos foram obtidos em supermercados de Santos-SP de acordo com sua disponibilidade. Algumas informações contidas nos rótulos foram avaliadas para que sejam escolhidos apenas produtos com alegações funcionais. Essas foram coletadas próximo ao dia de validade ( $\pm 5$  dias antes da data de validade) e transportadas imediatamente para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de São Paulo.

### **3.2 Preparo das amostras**

O conteúdo dos frascos foi homogeneizado pela agitação, 20 vezes, do frasco ainda fechado. As aberturas dos frascos foram conduzidas, de forma asséptica, em câmara de fluxo laminar. Após abertura, alíquotas de 10 mL foram retiradas de cada embalagem com o auxílio de pipeta esterilizada e transferidas para um béquer com o objetivo da visualização de sua aparência. Assepticamente, alíquotas de 1 mL de amostras foram transferidas para frascos de diluição com 9 mL de água peptonada estéril a 0,1% (p/v). A partir desta diluição foram feitas as diluições subsequentes, necessárias à análise do produto.

### **3.3 Contagem de bactérias lácteas**

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com ICMSF (1986). A contagem de bactérias lácticas foi realizada pelo método de plaqueamento em profundidade ou *pour plate*,

adicionando-se 1 mL de inóculo e vertendo-se pequena quantidade de ágar MRS em placas de Petri. Após secagem do meio, uma sobrecamada foi adicionada, visando a criação de atmosfera de 15% de CO<sub>2</sub>, seguida de incubação a 30°C por 5 dias.

### **3.4 Determinação da atividade antioxidante**

O extrato antioxidante foi preparado através da extração do iogurte ou leite fermentado com uma solução de acetona gelada 80%. A extração foi repetida duas vezes de modo a extrair quantitativamente os compostos bioativos. Os extratos obtidos em cada uma das extrações foram misturados, evaporados e concentrados a vácuo para remoção de toda a acetona, em seguida o extrato foi liofilizado e armazenado em ultrafreezer (-45 °C). O método se baseia na formação de radicais peroxila pela degradação térmica do AAPH a 37°C, em meio homogêneo (ORAC): em microplacas pretas de 96 poços serão transferidos 150 µL de fluoresceína (61 nM, preparada em tampão fosfato 75 mM, pH 7,4). Em seguida serão adicionados 25 µL do extrato antioxidante do iogurte em 3 diferentes diluições (100, 500 e 1000 vezes) em tampão fosfato. A microplaca será incubada por 10 minutos a 37°C sob agitação intermitente. Decorrido este tempo será adicionado a cada poço 25 µL de solução de AAPH (19 mM, preparada em tampão fosfato) e imediatamente a placa será introduzida no leitor de fluorescência (excitação: 485 ± 20 nm; emissão: 538 ± 20 nm) efetuando medidas a cada minuto durante 1 hora e meia (Rodrigues et al, 2012). Também serão efetuadas medidas do branco (solução tampão) ou padrão de Trolox a 64 µM (controle positivo). Os resultados serão obtidos através do uso de uma curva-padrão de Trolox e os resultados expressos em µmol de Trolox Equivalente/g de polpa.

### **3.5 Estatística**

As análises de contagem e atividade antioxidante dos produtos foram realizadas em triplicata e para detectar a diferença entre os diferentes tratamentos foi utilizada a ANOVA e o teste de Tukey (p<0,05).

### **3.6 pH**

A análise de pH foi realizada inserindo o eletrodo diretamente nas amostras com pHmetro eletrônico disponível no laboratório de microbiologia da UNIFESP *campus* Baixada Santista no dia de aquisição dos produtos.

## **4. Resultados e discussão**

Os iogurtes e leites fermentados analisados tinham características sensoriais compatíveis as descritas pela instrução normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007 do ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, que preza que o aspecto seja de *consistência firme, pastosa, semisólida ou líquida*, a cor seja *branca ou de acordo com a(s) substância(s) alimentícia(s) e/ou corante(s)*

adicionado(s), o odor e sabor sejam *característicos ou de acordo com a(s) substância(s) alimentícia(s) e/ou substância(s) aromatizante(s)/saborizante(s) adicionada(s)*.

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos para a contagem de bactérias lácticas e pH das seis amostras avaliadas no presente trabalho.

Tabela 1. Contagem de bactérias lácticas e pH dos produtos lácteos avaliados

<b>Produto lácteo</b>	<b>Bactérias lácticas (UFC/g)*</b>	<b>pH</b>
A	<10 <sup>c</sup>	5,09
B	<10 <sup>c</sup>	4,25
C	5,34 x 10 <sup>10a</sup>	4,52
D	6,2 x 10 <sup>9b</sup>	4,17
E	1,6 x 10 <sup>10a</sup>	4,85
F	<10 <sup>c</sup>	4,27

\**Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa (p < 0,05)*

Em relação aos resultados da contagem de bactérias lácticas, podemos analisar que os valores obtidos foram abaixo do esperado pela legislação vigente da ANVISA de 2008 nas amostras A, B e F. As unidades formadoras de colônia (UFC) deveriam estar entre 10<sup>8</sup> e 10<sup>9</sup> UFC até o prazo de validade, mas 3 destas amostras não atingiram o padrão mínimo.

Os produtos A e B eram da mesma marca e da mesma proposta de comércio e eram comercializados em uma embalagem atípica, feita para manter a refrigeração e a qualidade do produto por mais tempo e parte desta diferença na contagem de bactérias lácticas pode se dever a isto. Já o produto F era de marca diferente e continha aveia em sua composição. Uma hipótese é que a aveia possa ter sido submetida a algum tratamento específico em seu processamento, já que um produto similar da mesma marca, mas sem adição de aveia alcançou os valores mínimos estabelecidos pela legislação e os produtos se encontravam na mesma proximidade de prazos de validade.

Estes valores abaixo do esperado, podem se dever a uma série de fatores. Como sugere Almeida *et al* (2015), uma redução no número de bactérias lácticas pode estar relacionada à falhas tecnológicas na fabricação e a uma exposição inadequada de temperatura na estocagem e comercialização dos produtos.

Além disso, uma hipótese para o não crescimento é de que pode ter ocorrido interação entre as espécies de micro-organismos presentes, ou pode ter ocorrido uma indisponibilidade para o crescimento da cepa específica no meio de cultura, também pode ter havido algum inibidor de crescimento na composição do produto e o crescimento pode até ter sido influenciado pela quantidade de açúcar (pressão osmótica), entre outros fatores.

Em relação aos compostos bioativos, devido a sua grande importância diante de suas diversas funções biológicas, esperava-se encontrar quantidades significantes nos alimentos

analisados e é possível constatar através da tabela 2 que os produtos que demonstraram maior valor de atividade antioxidante pelo método ORAC foram respectivamente o produto C, um leite fermentado sem adição de polpa de frutas, seguido do E, um leite fermentado com adição de polpa de morango.

Tabela 2. Resultados da determinação da atividade antioxidante dos produtos lácteos avaliados

Produto lácteo	Atividade Antioxidante ( $\mu\text{mol TE/g}$ )*
A	$24,1^a \pm 0,1$
B	$29,9^a \pm 0,2$
C	$41,3^a \pm 0,1$
D	$6,4^b \pm 0,3$
E	$38,5^a \pm 1,2$
F	$5,6^b \pm 0,4$

\*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ )

Depois dos dois valores principais, a ordem é sucessivamente o produto B, um iogurte com adição de preparado de suco de maçã, polpa de banana e de mamão e logo depois o produto A, também um iogurte adicionado de polpa de morango. Por último, aparecendo com valores consideravelmente mais baixos, o produto F, um leite fermentado com adição de preparado de aveia e o produto D, um leite fermentado sem adição de polpas.

Assim, não foi possível observar influência direta de variáveis na composição frente a ação antioxidante dos alimentos analisados, por exemplo o fato da ação antioxidante não estar diretamente relacionada com a presença ou não da polpa de fruta ou de tratar de ser iogurte ou leite fermentado.

Analisando os dados obtidos também não foi possível fazer uma associação entre a quantidade de bactérias lácticas e os valores de atividade antioxidante das amostras.

Em relação ao pH dos produtos, os valores variaram de 4,05 a 5,09 e o pH ideal de conservação de iogurtes deve variar entre 4,0 - 4,4 (FERNANDES et al., 2013), demonstrando que algumas amostras tiveram valores ligeiramente mais básicos do que o esperado. Além disso, os valores aferidos não tiveram relação direta de interferência com a quantidade de bactérias lácticas viáveis nem com a atividade antioxidante nas amostras.

## 6. Conclusão

Por fim, podemos observar que o presente estudo não demonstrou relação direta da ação antioxidante com a quantidade de bactérias lácticas e também não foi possível estabelecer relação direta com o pH nas amostras analisadas. Porém, estas são apenas algumas das variáveis que podem ser relacionadas à ação antioxidante dos alimentos, fazendo-se necessário a busca por relações deste tipo.

## 7. Referências

ABE, Lucile T; LAJOLO, Franco M; GENOVESE, Maria Inés. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [s.l.], v. 92, n. 8, p.1679-1687, 16 dez. 2011. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.5531>.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. Brasília, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde**. 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>>. Acesso em: 28 nov. 2017.

ALMEIDA, Denise Milleo. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE VIDA DE PRATELEIRA DE IOGURTE COM DE POLPA DE FRUTA POR MEIO DA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS TOTAIS. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1671-1681, 30 jul. 2015. Universidade Tecnológica Federal do Parana (UTFPR). <http://dx.doi.org/10.3895/rbta.v9n1.1695>.

ALMEIDA, Maria Mozarina Beserra et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, [s.l.], v. 44, n. 7, p.2155-2159, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.051>.

AMARA, A.a.; SHIBL, A.. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.107-114, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2013.07.001>.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 2, de 7 de janeiro de 2002**. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Diário Oficial da União, Poder Executivo, de 9 de janeiro de 2002.

Brasil. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Brasília, DF, nº 205, 24 outubro 2007. Seção 1, p. 4.

DALIRI, Eric Banan-mwine; LEE, Byong H.. New perspectives on probiotics in health and disease. **Food Science And Human Wellness**, [s.l.], v. 4, n. 2, p.56-65, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2015.06.002>.

FERNANDES, E. N.; et al. Qualidade físico química de iogurtes comercializados em Viçosa (MG). *Anais. V SIMPAC*, v. 5, n. 1, p. 519-524, 2013.

ICMSF. (1986). *Microorganisms in foods. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications* (2nd ed., Vol. 2). Toronto: University of Toronto Press.

MOREIRA, Silvia Regina et al. Análise microbiológica e química de iogurtes comercializados em Lavras - MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.147-152, jan. 1999. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20611999000100027>.

PEDROSO, Silvia Helena Sousa Pietra. **Ação probiótica da levedura *Saccharomyces boulardii***. 2011. 102 f. Monografia (Especialização) - Curso de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

RE, Roberta et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 26, n. 9-10, p.1231-1237, maio 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3).

SANTOS, Ferlando Lima et al. Analysis of technology patents related to probiotics, prebiotics and symbiotic in Brazil. **Brazilian Journal Of Food Technology**. Campinas, p. 252-258. set. 2014. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1981-67232014000300010&lang=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-67232014000300010&lang=pt)>. Acesso em: 3 nov. 2017.