

Bactérias formadoras de endósporos em bebidas vegetais: uma abordagem voltada para o ensino médio

Palavras-Chave: Plant-based, Bactérias Esporogênicas, Esterilidade Comercial.

Autores(as):

Cristiano Ronaldo de Proença¹, FEA - Unicamp

Manuela Triboci Faria¹, FEA - Unicamp

Mariane Chine Rodrigues¹, FEA - Unicamp

Clara Mariana Gonçalves Lima¹ FEA - Unicamp

Anderson S. Sant'Ana¹ FEA – Unicamp

1- INTRODUÇÃO

As bactérias formadoras de endósporos são comumente encontradas no solo, estão envolvidas na decomposição da matéria orgânica, são habitantes naturais do trato gastrointestinal de insetos e de muitas espécies de animais de sangue quente (POSTOLLEC et al., 2012) e constituem um ponto de especial atenção porque a matéria-prima uma vez contaminada com endósporos, formas resistentes ao processamento, poderá ter a população bacteriana aumentada e com produção de toxinas (SADEK et al., 2018).

A fisiologia das bactérias formadoras de endósporo é bastante diversa incluindo anaeróbios, aeróbios, fototróficos e quimolitotróficos. Os reais desencadeadores do processo utilizado como estratégia de sobrevivência desses organismos, podem variar nas diferentes espécies de bactérias gram-positivas e podem incluir outros aspectos além da carência nutricional. O estágio de esporulação termina quando a bactéria percebe que há a presença de fatores adequados para entrar no ciclo vegetativo novamente (MADIGAN et al., 2016). Acrescenta-se que as bactérias em questão podem aderir às superfícies de equipamentos industriais, formando biofilmes, fato que auxilia na sobrevivência e

persistência das mesmas e pode resultar em contaminação cruzada pós-processamento em várias operações unitárias na indústria de alimentos..

A presença e persistência de bactérias formadoras de endósporos nas indústrias de alimentos são, portanto, problemas reais, pois: 1) a natureza onipresente dos endósporos torna basicamente impossível prevenir sua presença em alimentos crus e ingredientes; 2) a pasteurização e os processos da indústria de alimentos inativam a microbiota vegetativa competitiva, mas falham em destruir endósporos resistentes ao calor; 3) as características adesivas dos endósporos aumentam a sua persistência em plantas industriais e 4) as condições adversas encontradas no processamento de rações ou ingredientes alimentares e tecnologias de embalagem podem melhorar a adaptação ou seleção de endósporos extremamente resistentes. É importante ressaltar que a falta de uma ferramenta de diagnóstico rápida e simples para detectar endósporos e o conhecimento limitado sobre sua prevalência e diversidade são os principais obstáculos para controlar os endósporos que entram na cadeia produtiva de alimentos (POSTOLLEC et al., 2012).

Apesar de parecer uma novidade, alguns alimentos *plant-based* estão presentes nos supermercados há alguns anos, como por exemplo, o “leite” e a “carne”, análogos aos de origem animal. O primeiro em evidência, por ser líder de vendas da categoria e constituir um mercado bilionário o qual é objeto de competição entre *startups* e multinacionais. O leite *plant-based* consiste em extratos hidrossolúveis à base de ingredientes de origem vegetal como cereais, leguminosas, nozes e pseudocereais. Nesse contexto, sabe-se que os consumidores estão cada vez mais exigentes e informados quanto à manutenção e promoção da saúde, bem como a preservação do meio ambiente. Sob essa perspectiva, o processamento dos alimentos está sendo modificado para atender às demandas de mercado. (YANG et al., 2021; MCCLEMENTS; GROSSMANN, 2021).

Objetivou-se, com esse estudo, isolar bactérias formadoras de endósporos em bebidas vegetais à base de plantas (“leite” *plant-based*) comercializados nos supermercados de Campinas - SP.

MATERIAL E MÉTODOS

Os extratos hidrossolúveis à base de plantas (30), de diferentes marcas, processadas em temperatura ultra alta (UHT) e comercializadas em embalagens cartonadas de 1 litro foram obtidas em supermercados de Campinas, SP, Brasil, escolhidos aleatoriamente e conforme a disponibilidade dos produtos em questão. Foram

transportadas até o Laboratório de Microbiologia Quantitativa de Alimentos (LMQA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os produtos foram individualmente fotografados e mantidos sob temperatura ambiente para posterior análises. Antes da abertura das embalagens, as mesmas foram desinfetadas com álcool 70%.

No teste de esterilidade comercial, para cada amostra, foram inoculados 2 ml em 4 tubos contendo 19 ml de meio PE-2 e em 4 tubos contendo 19 ml do meio Caldo Dextrose Triptona (DTB). Foram retirados 50 ml de cada amostra com posterior transferência para tubos rosqueáveis com a finalidade de serem armazenados, sob refrigeração, como contra-amostra. Os tubos PE-2 foram desaerados antes da inoculação e, após o esse procedimento, cobertos com 5 ml de Ágar Selo a 3%. A incubação foi realizada em estufa de 35 °C (2 tubos de PE-2 e 2 tubos de DTB) e 55 °C (2 tubos de PE-2 e 2 tubos de DTB) durante 7 dias. Nos tubos em que houve mudança da cor do meio de cultura do roxo para o amarelo, formação de gás nos tubos selados e digestão das ervilhas, foi realizado o procedimento de isolamento dos micro-organismos presentes (DA SILVA et al., 2021; APHA, 2015).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Em meio as 30 amostras de leites *plant-based* analisadas, haviam nove marcas as quais foram identificadas de A até I, sendo sete as matérias-primas base das formulações (aveia, castanha de caju, castanha do Brasil, amêndoas, coco, soja e arroz). Dentre elas, 97% (29 amostras) apresentaram crescimento de bactérias esporuladas. No meio PE-2, indicado para verificação de presença de bactérias esporogênicas anaeróbicas, 27 amostras cultivadas a 55 °C (termófilas) e 8 amostras à 35°C (mesófilas) foram isoladas. Somente 1 amostra apresentou crescimento no meio DTB a 35 °C.

Os endósporos bacterianos são resistentes a tratamentos de alta temperatura como o UHT, podendo permitir que esses micro-organismos germinem e cresçam durante o armazenamento do produto. Algumas espécies de *Bacillus*, por exemplo, causam doenças veiculadas por alimentos, podendo ser intoxicação diarreica e emética, outras são motivo de preocupação principalmente devido à deterioração dos alimentos, que resulta em perdas financeiras significativas para o setor industrial. Não é incomum que patógenos ou deteriorantes sejam encontrados em ingredientes vegetais, pois podem ser contaminados durante o plantio, colheita ou processamento (BARTULA et al., 2023).

Ainda, é possível ocorrer contaminação cruzada dos produtos acabados após o processamento. As bactérias formadoras de endósporos podem aderir às superfícies de equipamentos industriais, formando biofilmes, fato que auxilia na sobrevivência e persistência das mesmas. A esporulação nos biofilmes pode ocorrer em condições de baixo teor de nutrientes, acarretando em contaminação dos alimentos formulados. Está bem estabelecido na literatura que a germinação dos endósporos é desencadeada pela presença de agentes nutrientes e não nutrientes, os primeiros podem ser chamados de germinantes e ligam-se aos receptores germinativos na membrana interna do endósporo, desencadeando a germinação. O período de germinação é variável, a maioria dos endósporos germinam em torno de 30 a 60 minutos na presença de nutrientes, mas uma pequena porcentagem de endósporos permanece dormente podendo levar horas ou dias para germinar, são denominados de endósporos super dormentes (PEREIRA & SANT'ANA, 2018).

CONCLUSÃO

A indústria de alimentos é desafiada a desenvolver novas estratégias de processamento para os alimentos termoprocessados com o objetivo de minimizar e evitar a sobrevivência dos esporos altamente resistentes ao calor uma vez que as bactérias formadoras de esporos podem ser deteriorantes e/ou patogênicas.

Em pesquisas futuras, as bactérias esporuladas mesófilas e termófilas isoladas serão caracterizadas e identificadas.

REFERÊNCIAS

BARTULA, K., BEGLEY, M., LATOUR, N., & CALLANAN, M. (2023). Growth of food-borne pathogens *Listeria* and *Salmonella* and spore-forming *Paenibacillus* and *Bacillus* in commercial plant-based milk alternatives. **Food Microbiology**, 109, 104143.

DA SILVA, et al. Método APHA:2015 para teste de esterilidade comercial e determinação da causa da deterioração de alimentos de baixa acidez: **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**, v. 6, p. 444-452, 2021.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Artmed Editora, 2016.

McCLEMENTS, D. J.; GROSSMANN, L. The science of plant-based foods: Constructing next-generation meat, fish, milk, and egg analogs. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, p. 4049-4100, 2021.

PEREIRA, A. P. M.; SANT'ANA, A. S. Diversity and fate of spore forming bacteria in cocoa powder, milk powder, starch and sugar during processing: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 76, p. 101-118, 2018.

POSTOLLEC, F. et al. Tracking spore-forming bacteria in food: from natural biodiversity to selection by processes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 1-8, 2012.

POSTOLLEC, F. et al. Tracking spore-forming bacteria in food: from natural biodiversity to selection by processes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 1-8, 2012.

SADEK, Z. I. et al. Microbiological evaluation of infant foods quality and molecular detection of *Bacillus cereus* toxins relating genes. **Toxicology reports**, v. 5, p. 871-877, 2018.

YANG, M. et al. Comparison of physicochemical properties and volatile flavor compounds of pea protein and mung bean protein-based yogurt. **LWT**, v. 152, p. 112390, 2021.