

Combinação de ácido láctico e ultrassom no controle de *Salmonella* spp.

Combination of lactic acid and ultrasound in the control of *Salmonella* spp.

RESUMO

Anna Flávia Alcantara Rodrigues
annaflalcantara@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Elisabete Hiromi Hashimoto
elisabete.utfpr@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

O trabalho teve como objetivo avaliar a combinação do ácido láctico e banho ultrassônico como uma alternativa viável na inibição do crescimento de *Salmonella* spp. As concentrações testadas de ácido láctico foram de 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0%. Três inóculos das cepas padrões: *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (ATCC 14028), *S. Enteritidis* (ATCC 13076) e *S. Heidelberg* (ATCC 8326) foram testadas aplicando-se concentrações de ácido láctico combinada com ultrassom. Os testes foram conduzidos com tempos de exposição de 5, 10 e 15 minutos. Para inibição das cepas isoladas a concentração inibitória mínima de ácido láctico foi de 2%. A concentração de 1% de ácido láctico combinado com 45 kHz de ultrassom foi suficiente para inibir o crescimento das cepas padrões.

PALAVRAS-CHAVE: Ácido láctico. Ultrassom. *Salmonella* spp.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the combination of lactic acid and ultrasonic bath as a viable alternative to inhibit the growth of *Salmonella* spp. The tested concentrations of lactic acid were 1.0; 2.0; 3.0 and 4.0%. Inocula of the standard strains: *Salmonella enteric* serovar Typhimurium (ATCC 14028), *S. Enteritidis* (ATCC 13076) and *S. Heidelberg* (ATCC 8326) were tested by applying lactic acid concentrations combined with ultrasound. The tests were conducted with exposure times of 5, 10 and 15 minutes. For inhibition of isolated strains the minimum inhibitory concentration of lactic acid was 2%. The 1% lactic acid and concentration combined with 45 khz ultrasound was sufficient to inhibit the growth of standard strain.

KEYWORDS: Lactic acid. Ultrasound. *Salmonella* spp.

INTRODUÇÃO

O mercado da avicultura no Brasil tem muita força mundialmente, o país se destaca atualmente como o segundo maior produtor de carne de frango no mundo, chegando a exportar um terço de toda carne produzida por ano no Brasil. Devido à grande massa de produção de carne de frango, a qualidade do produto e a sua saúde sanitária são mais que desejável. Com a produção exacerbada de carne de frango, o controle de qualidade se torna difícil e um dos seus grandes empecilhos é a proliferação de microrganismos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, 2019).

Segundo o Ministério da Saúde (2011), a carne de ave é bem suscetível à contaminação de *Salmonella* spp, bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae, morfologicamente Gram negativa. A categoria que engloba a maioria dos sorovares desta bactéria são as que ganham enfoque na contaminação de alimentos por funcionarem como veículo de sua transmissão. No organismo humano, a *Salmonella* spp podem ocasionar quadros de gastroenterite, e por isso sua importância no controle de proliferação.

A pesquisa utiliza ácido láctico, um dos principais ácidos orgânicos formados em processos fermentativos naturais. O ácido láctico é capaz de diminuir o pH intracelular e aumentar a concentração iônica, por ter uma boa penetração à membrana celular da bactéria. Este aumento consequentemente eleva a pressão celular interna, fazendo que uma força contra a parede celular seja exercida e levando à morte (ZABOT, 2016).

O ultrassom é um equipamento que produz ondas sonoras que excedem a audição humana. A utilização do ultrassom está ganhando grande força no controle microbiológico devido sua sustentabilidade do meio ambiente e sua capacidade de cavitação, que tornam o ultrassom potencialmente capaz de auxiliar a penetração de agentes químicos nas células, como o ácido láctico, ou até mesmo destruí-las. A morte celular pode acontecer, pois quando as ondas sonoras percorrem o meio líquido, liberam alta energia por causa do colapso de bolhas, criando ondas de choque extremamente quentes e fortes, danificando a parede de celular daquele microrganismo (BELLO, 2003).

Tendo em vista este cenário, este trabalho teve como objetivo analisar a eficácia do ácido láctico no controle de contaminação de *Salmonella* spp combinado de banho ultrassom.

MATERIAIS E MÉTODOS

O teste foi padronizado com três cepas de *Salmonella* spp. padrões, sendo elas: *Salmonella* Typhimurium(ATCC 14028), *S. Enteritidis*(ATCC 13076) e *S. Heidelberg* (ATCC 8326) . As cepas de *Salmonella* spp. utilizadas no experimento foram reativadas em caldo BHI (Brain heart infusion) em tubos de ensaio e permaneceram em temperatura de 37°C por 24-48h, fornecendo local nutritivo afim de intensificar seu crescimento. Em seguida as amostras foram transferidas em placa de Petri em ágar TSA (Trypticase soy Agar) nas mesmas primeiras condições de temperatura e tempo de cultivo. Por meio da placa de Petri, foi selecionada uma colônia de cada cepa padrão e cultivada novamente em caldo BHI por 24-48h, agora para submeter o crescimento somente de uma colônia.

O inóculo foi diluído até atingir absorvância entre 0,08 e 0,100 no espectrofotômetro com 620 nm ou na escala 0,5 de Mac Farland e diluído novamente 1:10 em líquido de BHI. Segundo a Probac do Brasil (Produtos Bacteriológicos) a escala de 0,5 de Mac Farland equivale aproximadamente 1,5x10⁸ UFC/mL, porém devido a diluição, a concentração final no tubo teste 1,0 x10⁴UFC/mL.

Após a diluição do inóculo, o ácido láctico (peso molecular 90,08, concentração 85% marca Synth) foi diluído para preparação de uma solução estoque (6,55%) sendo este padronizado com solução de NaOH 0,1M o qual foi previamente padronizado com solução de biftalato de potássio (IAL, 2008).

Depois da realização da diluição da amostra e padronização do ácido láctico, 20µL da diluição foram transferidas em tubos nos quais nos quais uma solução de ácido láctico 6,55% foi diluído com água destilada estéril e 2 mL de água peptonada (0,1%), afim de obter se obter as concentrações finais de ácido láctico de: 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0%. Para expressar a quantidade do ácido láctico padrão a ser utilizada em cada tubo, usou-se a seguinte fórmula:

$$C_1V_1=C_2V_2 \quad (1)$$

Na equação (1) podemos analisar que existem dois valores de concentração, sendo o primeiro correspondente a concentração solução estoque (6,55%) e a segunda concentração condizente do ácido láctico que se deseja expor o inóculo. O que queremos buscar nesta equação é o primeiro volume, para sabermos quanto da solução estoque devemos colocar no tubo com 20 mL (V₂) para alcançar a concentração C₂.

O ultrassom utilizado no teste era da marca Eco-Sonics e modelo Q3.8/40, cujo trabalhava em 45 kHz. Os tubos que foram testados no ultrassom foram expostos em tempos de 0, 5, 10, 15 min. O controle sem ultrassom consistiu de banho gelado, no qual foram dispostos os tubos pelos mesmos tempos de exposição. Após o tempo de exposição ao ácido láctico e banho ultrassom uma alíquota de 20 µL foram inoculadas em microplaca, contendo 150µLde caldo BHI estéril em cada poço. Após este procedimento as microplacas foram incubadas a 37°C, por 24-48h. Para confirmação da inibição, uma alíquota de 100 µL dos poços em que não se observou turvação foram inoculadas em placas contendo ágar SS estéril que foram incubadas a 37°C, por 24-48h.

Uma bateria de tubos contendo ácido láctico foram preparadas nas mesmas condições do teste, exceto pela adição de inóculo, para medida de pH em pHmetro da marca Tecnal e modelo TEC-2 mp, previamente calibrado com auxílio de tampões de pH 7,00 e 4,00.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A tabela 1 apresenta os valores de pH nos tubos testes contendo ácido láctico em cada concentração que variou de 1,0 a 4,0%.

Tabela 1– pH referente das soluções de ácido láctico teste

Ácido láctico (% m/v)			
1	2	3	4

Ph	3,01	2,88	2,82	2,72
	3,02	2,87	2,77	2,72
	3,01	2,86	2,76	2,69
Média ± DP	3,01 ± 0,0047	2,87 ± 0,0082	2,78 ± 0,0262	2,71 ± 0,0141

Fonte: produção própria

A variação do pH nas concentrações obtiveram-se números próximos e concordantes entre si, analisando o desvio padrão. O maior desvio padrão foi calculado na concentração de 3% (0,0262), já nos demais o desvio padrão a estabilidade foi maior, sendo 4% (0,0141), 2%(0,0087) e o menor 1% (0,0047).

De acordo com a literatura, os valores mostrados na tabela estão todos adequados a uso para teste, por estarem abaixo do pKa do ácido láctico que é 3,86. O pKa quantifica a acidez e a basicidade de uma solução. A razão de caracterizarmos se o agente está mesmo em sua forma ácida é porque a acidez desempenha uma importância na ação antimicrobiana, de maneira que podem interferir no metabolismo de crescimento microbiano, o diminuindo-o, realizando a lise celular e liberando seu material citoplasmático, por isso o crescente aumento de acidez ajuda na inibição microbiana. (VIEIRA, 2016)

A tabela 2 ilustra o efeito do ácido láctico nas concentrações de 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0% na ação antimicrobiana de *Salmonella* spp nos tempos de exposição 0, 5, 10 e 15 minutos em água gelada.

Tabela 2 – Crescimento de *Salmonella* spp em concentrações de ácido láctico

Tempo de exposição (min)	Ácido láctico (% m/v)			
	1,0	2,0	3,0	4,0
0	SH/ST/SE	SH/ST/SE	SH/ST/SE	SH/ST/SE
5	SH/ST	ST	ST	ND
10	ST	ST	ST	ND
15	ST	ND	ND	ND

Fonte: produção própria. Onde SE, ST e SH representa que houve crescimento de *Salmonella* spp, sendo SE:S. Enteritidis, ST:S. Typhimurium, SH:S. Heidelberg.ND: crescimento não detectado.

A diminuição da presença de *Salmonella* spp com o aumento da concentração de ácido láctico é justificável, pois quanto maior, mais puro o ácido está presente na solução, conseguindo atuar com maior facilidade na bactéria. Podemos ver que na concentração mais alta de 4% houve inibição total das 3 *Salmonella* spp. em todos os tempos de exposição, já na concentração de 2,0 e 3,0% a inibição aconteceu nos 15 minutos de exposição, isso significa que o tempo de exposição também é importante para controle da proliferação, quanto maior o tempo que a bactéria está em contato com o ácido, maior a chance dele conseguir penetrar na membrana da célula e mexer na estrutura interna.

Na concentração de 1,0% a *S. Typhimurium* cresceu em todos os tempos, essa bactéria resistiu nas outras concentrações com exceção de 4,0%, se apresentando como a cepa mais resistente ao ácido láctico. A *S. Enteritidis* foi a

mais sensível ao ácido láctico, não crescendo em contato a qualquer concentração do ácido e a S. Heidelberg cresceu apenas no tempo 5 com concentração de 1%.

O ácido láctico é um dos ácidos mais potenciais para ação antimicrobiana. Este ácido atua na bactéria com efeito bactericida e bacteriostático. O efeito bacteriostático atua na bactéria, neste caso Salmonella spp, dificultando a multiplicação bacteriana, grandes partes desses agentes são inibidores de síntese proteica. Já a ação do ácido láctico como bactericida faz dele capaz inibir enzimas que são fundamentais que mantêm o microrganismo vivo (AGENTES ANTIMICROBIANOS QUÍMICOS E NATURAIS, 2010).

A tabela 3 representa a atuação da concentração de ácido láctico no controle de Salmonella spp combinado de banho de ultrassom.

Tabela 3 – Crescimento de Samonella spp em ácido láctico combinado com ultrassom

Tempo de exposição (min)	Ácido láctico (% m/v)			
	1,0	2,0	3,0	4,0
0	SH/ST/SE	SH/ST/SE	SH/ST/SE	SH/ST/SE
5	SH/ST	ND	ND	ND
10	ND	ND	ST*	ND
15	ND	ND	ND	ND

Fonte: produção própria. Onde SE, ST e SH representa que houve crescimento de Samonella spp, sendo SE:S. Enteritidis, ST:S. Typhimurium, SH:S. Heidelberg.ND: crescimento não detectado. ST* crescimento da S. Typhimurium na placa com SS ágar.

A presença do ultrassom teve uma diferença significativa na proliferação microbiana, podemos ver que um ácido láctico de menor concentração, desde 2%, quando combinado de um banho de ultrassom tem a mesma eficiência comparada ao ácido láctico de 4% representado na tabela 2, onde só havia a presença de ácido. O auxílio do ultrassom facilita muito na inibição microbiana, já que assim é preciso de um gasto menor de ácido láctico na sanitização de aves.

O ultrassom aumenta a efetividade de inibição, pois consegue fragilizar e afinar a membrana celular da bactéria. Suas ondas mecânicas facilitam a penetração do ácido láctico, além disso, foi comprovado que o ultrassom consegue desnaturar enzimas quando submetido à alta intensidade. Há fatores que influenciam na eficácia do ultrassom, como o tempo de exposição, amplitude de suas ondas, temperatura e composição da bactéria, de maneira que as bactérias gram-negativas, como Salmonella spp, são mais frágeis que as gram-positivas, devido a parede celular ser mais espessa (ULTRASSOM NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS: APLICAÇÕES NO PROCESSAMENTO E CONSERVAÇÃO, 2018).

CONCLUSÃO

Os resultados mostram que houve uma sensibilidade maior de Samonella Enteritidis com ácido láctico e ultrassom, ao contrário de Samonella Typhimurium que apresentou mais resistência ao teste. O uso do ultrassom com ácido láctico teve uma eficácia bem maior do que somente o uso de ácido láctico. O experimento agrega vantagens não somente na saúde pública como também econômicas. A abordagem do método utilizado trás atribuições às pesquisas que

são direcionadas a acharem, assim como este, métodos mais eficazes e novos para aplicação industrial. A pesquisa tem como objetivo de continuar, agora testando a resistência das amostras de origem de carcaças de frango de um frigorífico da região situada no oeste de Santa Catarina.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Universidade Tecnológica Federal do Paraná por me proporcionar fisicamente o espaço para realização da minha iniciação científica tanto como os meios e agradeço também a professora doutora Elisabete Hiromi Hashimoto por me transmitir conhecimento durante o tempo de realização da pesquisa.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (São Paulo). O Brasil Avícola. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/resumo>>. Acesso em: 26 jun. 2019.

BRASÍLIA. DEPARTAMENTO DE APOIO À GESTÃO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da Salmonella spp.: Diagnóstico Laboratorial do Gênero Salmonella. 2011. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/manual-diagnostico-salmonella-spp-web.pdf>>. Acesso em: 25 jun. 2019.

ZABOT, Sandra. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E COMPOSTOS CLORADOS SOBRE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS EM CARNE DE FRANGO. 2016. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2016. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/1662/1/LD_PPGTAL_M_Zabot%2C%20Sandra_2016.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2019.

BELLO, Antonio Roberto Crystal. ESTUDO DA EFICIÊNCIA DAS ONDAS DE ULTRASOM EM RELAÇÃO AO HIPOCLORITO DE SÓDIO E À FILTRAÇÃO ADSORÇÃO NA ELIMINAÇÃO DE MICRORGANISMOS EM ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ÁGUA. 2003. 116 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/95027/bello_arc_me_rcla.pdf?sequence=1>. Acesso em: 09 jul. 2019.

VIEIRA, Estevão Alan. Influência do pH na atividade antimicrobiana de ramnolípídeos frente a Staphylococcus aureus. 2016. 53 f. Monografia (Especialização) - Curso de Bacharel em Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016. Disponível em: <<file:///C:/Users/Aluno/Downloads/EstevaoAlanVieira.pdf>>. Acesso em: 08 jul. 2019.

AGENTES ANTIMICROBIANOS QUÍMICOS E NATURAIS. São Paulo: Food Ingredients Brasil, n. 15, 2010. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/155.pdf>>. Acesso em: 11 jul. 2019.

ULTRASSOM NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS: APLICAÇÕES NO PROCESSAMENTO E CONSERVAÇÃO. Belo Horizonte: Atena Editora, 2018. Disponível em: <<https://www.atenaeditora.com.br/wp-content/uploads/2018/09/E-book-Ultrassom-na-ind%C3%BAstria-de-alimentos-2.pdf>>. Acesso em: 11 jul. 2019