

SORVETE SUPLEMENTADO COM *Lactobacillus casei* CSL3, ANÁLISE DE VIABILIDADE

KHADIJA BEZERRA MASSAUT¹; MARIA FERNANDA FERANDES SIQUEIRA²;
HELENA REISSIG SOARES VITOLA³; ALANE LEMES OLIVEIRA⁴; WLADIMIR
PADILHA DA SILVA⁵; ÂNGELA MARIA FIORENTINI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas (UFPe) – khadijamassaut@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas (UFPe) – maria.fernanda.fs97@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas (UFPe) – helenarsv@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas (UFPe) – alaneh09@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas (UFPe) – wladimir.padilha2011@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas (UFPe) – angefiore@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Desenvolver novos produtos, onde segurança, saúde e benefício econômico estejam aliados, tem impulsionado cada vez mais o mercado consumidor mundial (SAAD et al., 2011; BELLINAZO et al., 2019). Sob essa perspectiva, alimentos probióticos tem recebido maior destaque, por serem capazes de fornecer benefícios adicionais à saúde do consumidor, desde que administrados em quantidades adequadas (FAO/WHO, 2001; FERREIRA, 2003; SAAD et al., 2011).

Em virtude, da ampla gama de cepas utilizadas na produção de alimentos fermentados, inúmeros autores relatam a importância do emprego das bactérias ácido lácticas (BAL) na tecnologia de alimentos, pois possuem a capacidade de atuar na bioconservação através da produção de substâncias antimicrobianas, provenientes do seu metabolismo como ácidos orgânicos e bacteriocinas, por exemplo (KYUNGWHA & AZLIN, 2007), e, também, na modificação de características sensoriais, como sabor e textura (SAAD et al., 2011; REIS et al., 2012).

A adição dessas bactérias, pode ser realizada de forma que estas façam parte do processo de fermentação, atribuindo positivamente características sensoriais ao alimento ou, por suplementação, onde ocorre a adição ao final do processo, sem causar quaisquer alterações, porém mantendo os benefícios atribuídos à bactéria (ARAGON-ALEGRO et al., 2007).

VITOLA et al. (2018), observaram características satisfatórias ao analisarem o potencial probiótico do isolado *Lactobacillus casei* CSL3, proveniente de silagem de colostro bovino, cuja viabilidade em manteiga probiótica por BELLINAZO et al. (2019) e em iogurte simbiótico por AMES (2019), foi avaliada e considerada satisfatória.

Por ser um produto cujo processamento e armazenamento ocorrem sob temperatura reduzida (-18 °C), conter ingredientes como açúcares, gorduras e proteínas, bem como um pH próximo à neutralidade, características que auxiliam e favorecem a sobrevivência das bactérias, o sorvete apresenta-se como uma eficaz matriz alimentar (CRUZ et al., 2009; HOMAYOUNI et al., 2012). Ademais, por possuir fácil digestibilidade, sabor adocicado e textura macia, é um alimento aceito por todas as faixas etárias, tornando-o um produto bastante atrativo para o setor industrial (CRUZ et al., 2009).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a viabilidade de *L. casei* CSL3 suplementado em sorvete, durante o armazenamento.

2. METODOLOGIA

Inicialmente, foi realizado o cultivo do microrganismo *L. casei* CSL3, em caldo De Man Rogosa & Sharpe (MRS) por 18 horas a 37 °C, sob agitação constante a 130 oscilações/minuto. Após, o caldo foi centrifugado a 4165 g, por 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante descartado e, sobre o *pellet* foi adicionado leite em pó desnatado reconstituído esterilizado (10% m/v). Na sequência, o microrganismo foi liofilizado. A contagem de células viáveis liofilizadas, foi realizada em placas contendo ágar MRS, incubadas à 37 °C, por 48 horas, sob anaerobiose. E as culturas foram armazenadas a -70 °C, até a aplicação na matriz alimentar.

Para realização do estudo, o sorvete foi adquirido no comércio local da cidade de Pelotas/RS e mantido sob refrigeração até a realização do experimento. As células liofilizadas de *L. casei* CSL3 foram ressuspensas em leite integral na proporção de 1:30 (1 g de cultura liofilizada para 30 mL de leite integral esterilizado) e incubadas em agitador (Agimaxx®) a 150 rpm por 30 min a 37 °C. Imediatamente, 0,1% da cultura probiótica (10^{14} UFC.g⁻¹) foi acrescentada para formar uma concentração inicial de bactérias de 10^{12} UFC.g⁻¹. O sorvete foi misturado com uma espátula por 30 segundos para homogeneização adequada da bactéria probiótica. E, as amostras foram colocadas em recipientes plásticos de 100 mL e armazenadas a -18 °C, até o momento da análise.

As análises microbiológicas para o monitoramento da viabilidade foram realizadas em triplicata: após a preparação do sorvete (tempo 0) e em 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento congelado conforme descrito por CRUXEN et al. (2017). Para determinação da contagem de células viáveis, 10 g de amostra foram homogeneizados em 90 mL de água peptona a 0,1% (Oxoid®). Em seguida, foram realizadas diluições decimais em série (até 10^{-10}) e inoculados 0,1 mL da suspensão em placas de Petri contendo ágar MRS. As placas foram alocadas sob condições anaeróbias e incubadas durante 48 horas a 37 °C.

As análises estatísticas foram realizadas no programa *Graphpad Prism*® 6.0 através dos testes: *Two-way* Anova e *Tukey* para correlação de variância entre os períodos, considerando-se o nível de significância de ($p < 0,05$).

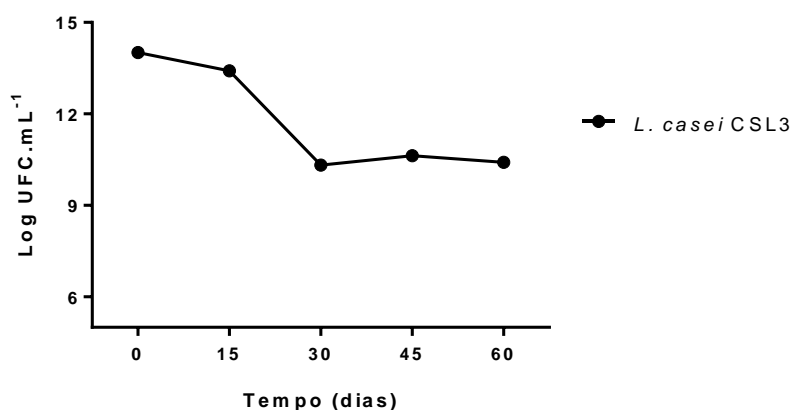
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises microbiológicas ao longo do período de armazenamento, demonstraram que houve uma redução significativa na contagem de células viáveis do sorvete suplementado com *L. casei* ($p = 0,0145$, Anova). E, na realização do pós teste (*Tukey*), verificou-se que os tempos zero vs 30 dias ($p = 0,0446$) e zero vs 60 dias ($p = 0,0484$) apresentaram reduções significativas, indicando que quanto maior o tempo de armazenamento, menor a viabilidade do microrganismo no produto. VALÉRIO et al. (2014), relataram que este declínio da contagem de microrganismos após o congelamento prolongado, dá-se ao fato de que este processo pode proporcionar a injúria da célula, em virtude da cristalização das estruturas celulares dos probióticos, levando eventualmente à sua morte. Contudo, o estresse mecânico e a incorporação de ar durante o mesmo, também são capazes de influenciar na redução da população bacteriana, de forma que quanto maior o tempo de exposição às baixas temperaturas, menor será a atividade celular (HOMAYOUNI et al., 2012; TRIPATHI & GIRI, 2014).

Entretanto, VALÉRIO et al. (2014) não verificaram diferenças significativas nas populações de *L. acidophilus* La-5, durante 28 dias de armazenamento a -18 °C de sorvete com e sem adição de inulina, dados também observados por CRUXEN et al. (2016), após 90 dias de armazenamento a -18 °C de sorvete de

butiá suplementado com *Bifidobacterium lactis*, e, por NOUSIA et al. (2011) em sorvete suplementado com *L. acidophilus* LMGP-21381 por 45 semanas a -15 °C e -25 °C. Diferentemente do observado no presente estudo onde, embora em concentrações elevadas, houve redução das populações bacterianas durante o período de armazenamento (de 14,01 log UFC.g⁻¹ para 10,41 log UFC.g⁻¹, respectivamente) (Figura 1).

Figura 1 – Viabilidade de *L. casei* CSL3 em sorvete durante 60 dias de armazenamento.



BELINAZO et al. (2019), observaram que a adição de *L. casei* CSL3 em manteiga armazenada durante 60 dias sob refrigeração (4 °C), apresentou células viáveis em concentrações > 6 log UFC.g⁻¹ e, AMES (2019), em iogurte com *L. casei* CSL3 imobilizado em aveia, também verificou uma viabilidade satisfatória do microrganismo (8,78 log UFC.g⁻¹), durante 25 dias de armazenamento sob 4 °C. Resultados que corroboram com o presente estudo, tendo em vista que as contagens celulares após 60 dias de armazenamento a -18 °C, foram de 10,41 log UFC.g⁻¹, indicando que o *L. casei* CSL3, apresenta alta taxa de sobrevivência, mantendo-se em concentração superior a recomendação para alimentos probióticos, 6-7 log UFC.g⁻¹ (FAO/WHO, 2002).

4. CONCLUSÕES

A bactéria ácido láctica, *L. casei* CSL3, isolada de silagem de colostro bovino, apresentou-se como microrganismo probiótico promissor para adição em alimentos lácteos, como o sorvete, uma vez que manteve as concentrações de células viáveis satisfatoriamente, com valores acima do preconizado pela legislação mundial.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMES, C.W. ***Lactobacillus casei* CSL3: imobilização celular em aveia e aplicação como cultura probiótica na produção de iogurte.** 2019. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

ARAGON-ALEGRO, L.C.; ALEGRO, J.H.A.; CARDARELLI, H.R.; CHIU, M.C.; SAAD, S.M.I. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT-Food Science and technology**, v. 40, p. 669-675, 2007.

- BELLINAZO, P.L.; VITOLA, H.R.S.; CRUXEN, C.E.S.; BRAUN, C.L.K.; HACKBART, H.C.S.; SILVA, W.P.; FIORENTINI, A.M. Probiotic butter: Viability of *Lactobacillus casei* strains and bixin antioxidant effect (*Bixa orellana* L.). **Journal of Food Processing and Preservation**, e14088. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpp.14088>. 2019.
- CRUXEN, C.E.S.; HOFFMANN, J.F.; ZANDONÁ, G.P.; FIORENTINI, A.M.; ROMBALDI, C.V.; CHAVES, F.C. Probiotic butiá (*Butia odorata*) ice cream: Development, characterization, stability of bioactive compounds, and viability of *Bifidobacterium lactis* during storage. **LWT - Food Science and Technology**, DOI: 10.1016/j.lwt.2016.09.011. 2016.
- CRUZ, A. G.; ANTUNES, A. E.C.; SOUSA, A. L. O.P.; FARIA, J. A.F.; SAAD, S. M.I. Ice-cream as a probiotic food Carrier. **Food Research International**, v. 42, p. 1233-1238. 2009.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization FAO/WHO. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001, p. 34. Acessado em: 7 mai. 2019. Online. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization. FAO/WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. London, Ontario, Canada. 2002.
- FERREIRA, C.L.L.F. Grupo de bactérias lácticas – Caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: FERREIRA, C.L.L.F. **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospeção**. Viçosa, p.206, 2003.
- HOMAYOUNI, A.; Azizi, A.; Javadi, M.; Mahdipour, S.; Ejtahed, H. Factors influencing probiotic survival in ice cream: a review. **International Journal of Dairy Science**, v. 7 (1), p.1-10. 2012.
- KYUNGWHA, L.; AZLIN, M. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on sliced roast beef by cetylpyridinium chloride and acidified sodium chlorite. **Food Microbiology**, v. 24, n. 1, p.89- 94. 2007.
- NOUSIA, F.G.; ANDROULAKIS, P.I.; FLETOURIS, D;J. Survival of *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 in probiotic ice cream and its influence on sensory acceptability. **International Journal of Dairy Technology**, v.64, p.130-136, 2011.
- REIS, J.A.; PAULA, A.T.; CASAROTTI, S.N.; PENNA, A.L.B. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial compounds: characteristics and applications. **Food Engineering Reviews**, v. 4, n. 2, p.124–140. 2012.
- SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1 ed. São Paulo: Varela, 699p. 2011.
- TRIPATHI, M.K., & GIRI, S.K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p.225–241. 2014.
- VALÉRIO, Geisa Demele. **Desenvolvimento de sorvete funcional: avaliação de suas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais**. 2014. 65 f. Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite – Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2014.
- VITOLA, H.R.S.; DANNENBERG, G.S.; MARQUES, J.L.; LOPES, G.V.; SILVA, W.P.; FIORENTINI, A.M. Probiotic potential of *Lactobacillus casei* CSL3 isolated from bovine colostrum silage and its viability capacity immobilized in soybean. **Process Biochemistry**, v.73, p.1-7. 2019.