

SORVETE SUPLEMENTADO COM MICRORGANISMOS POTENCIALMENTE PROBIÓTICOS: ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR SOB ARMAZENAMENTO PROLONGADO

KHADIJA BEZERRA MASSAUT¹; MARIA FERNANDA FERNANDES SIQUEIRA²; MARINA VIEIRA FOUCHY³; AMANDA ELIS BRUINSMA⁴; WLADIMIR PADILHA DA SILVA⁵; ÂNGELA MARIA FIORENTINI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – khadijamassaut@gmail.com

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

³Universidade Federal de Pelotas – marinavieira01@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – amanda.bruinsma@hotmail.com

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

⁶Universidade Federal de Pelotas – angefiore@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Mudanças no perfil de consumo da população mundial são cada dia mais evidentes, onde um estilo de vida com opções de alimentos saudáveis tem recebido bastante destaque (ASIOLI et al., 2017). Essas mudanças, vêm impulsionando a indústria alimentícia a desenvolver alimentos diversificados, que atendam as necessidades do consumidor (TERPOU et al., 2019).

Nesse contexto, a oferta de alimentos probióticos, suplementados ou não, têm recebido importante destaque, uma vez que, são microrganismos capazes de conferir benefícios ao hospedeiro, quando consumidos regularmente e em quantidades adequadas (FAO/WHO 2001). No entanto, é necessário que os microrganismos resistam às etapas de processamento e distribuição do alimento, permanecendo viáveis e funcionais durante o período de vida útil do produto (RANADHEERA et al. 2010).

Por possuir boa aceitabilidade em todas as faixas etárias e etnias, o sorvete, um alimento composto majoritariamente por proteínas e gorduras e cujo processamento e armazenamento se dá sob baixas temperaturas, tem sido evidenciado como um adequado veículo para suplementação com probióticos (RANADHEERA et al. 2010; HOMAYOUNI et al., 2012; ABIS, 2019).

Entre as bactérias probióticas, espécies como *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. são frequentemente aplicadas em alimentos, tendo em vista seus benefícios comprovados na modulação da resposta imune e regulação da microbiota intestinal (COSTA & VARAVALLA, 2011). *Lactobacillus casei* CSL3, isolado de silagem de colostro bovino por VITOLA et al. (2018), e *Pediococcus pentosaceus* P97, isolado de presunto por MARQUES (2018), apresentaram segurança e potencial probiótico em testes *in vitro*. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a viabilidade de ambos isolados, suplementadas em sorvete, durante o armazenamento sob congelamento prolongado.

2. METODOLOGIA

Os microrganismos *L. casei* CSL3 e *P. pentosaceus* P97 foram previamente cultivados, liofilizados e armazenados a -70 °C, até sua utilização e o sorvete foi obtido no comércio local da cidade de Pelotas/RS.

Para a suplementação do sorvete, as células liofilizadas de ambos microrganismos foram ressuspensas, individualmente, 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. Na sequência,

0,1% das culturas probióticas ($14 \text{ Log UFC.g}^{-1}$) foi adicionada ao sorvete (mantido em refrigeração), sendo misturada com uma espátula por 30 segundos para homogeneização adequada, obtendo-se sorvete suplementado com *L. casei* CSL3 (LC) e um sorvete suplementado com *P. pentosaceus* P97 (PP). As amostras foram distribuídas em recipientes plásticos de 100 mL e armazenadas a -18°C , até o momento da análise. As contagens para determinar a viabilidade das bactérias foram realizadas no tempo 0, 30, 60, 90 e 180 dias de armazenamento a -18°C . 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 seriadas (até 10^{-11}) e inoculados 0,1 mL da suspensão em placas de Petri contendo ágar De Man Rogosa & Sharpe (MRS). As placas foram incubadas sob condições de anaerobiose a 37°C , durante 48 horas.

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme pode ser observado na Tabela 1, *L. casei* CSL3 apresentou concentração inicial ($14 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$) e variação final ($4 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$) maior que *P. pentosaceus* P97 ($13 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ e $2,5 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$, respectivamente), indicando que isolados de espécies diferentes, podem apresentar comportamentos díspares em uma mesma matriz alimentar.

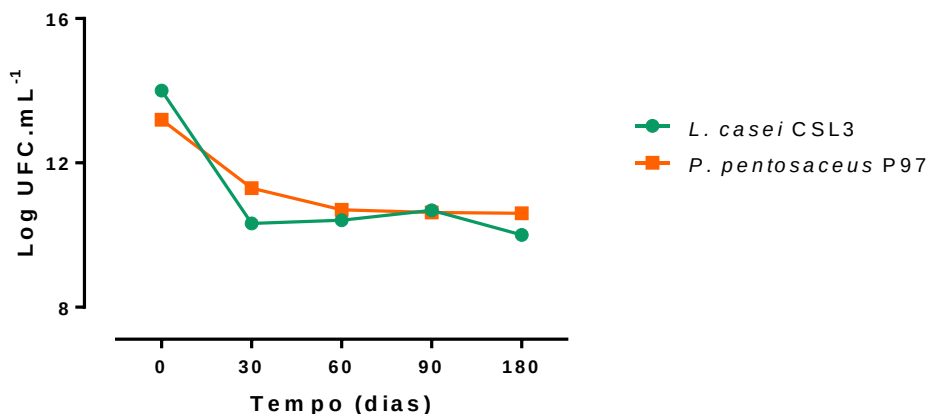
Tabela 1 – Viabilidade de *Lactobacillus casei* CSL3 e *Pediococcus pentosaceus* P97 ($\text{Log de UFC.mL}^{-1}$) suplementados em sorvete, sob armazenamento prolongado em -18°C .

Tempo em dias	<i>L. casei</i> CSL3		<i>P. pentosaceus</i> P97	
	Média	± DP	Média	± DP
0	14,01	0,05	13,20	0,23
30	10,32	0,36	11,30	0,06
60	10,41	0,10	10,70	0,08
90	10,69	0,02	10,63	0,12
180	10,00	0,18	10,61	0,08

± DP - desvio padrão

E, segundo demonstrado na Figura 1, foi observada interação entre os microrganismos e o período de armazenamento do produto ($p < 0,0001$), sendo verificado que o tempo foi fator significativamente determinante na viabilidade de ambas bactérias ($p < 0,0001$). Sendo que, as diferenças estatísticas foram manifestadas nos tempos 0 e 30 dias de armazenamento ($p < 0,0001$ para ambos) e, também, no tempo 180 dias ($p = 0,0004$).

Figura 1 – Viabilidade de *Lactobacillus casei* CSL3 e *Pediococcus pentosaceus* P97 suplementados em sorvete, durante 180 dias de armazenamento em -18°C .



Os resultados sugerem que o sorvete, embora seja um alimento com significativas concentrações de ar incorporado, fator responsável pela sua maciez e consistência, foi eficaz em proteger ambos microrganismos do estresse oxidativo ocasionado pela presença de oxigênio, tendo em vista que as concentrações exigidas pela legislação para alimentos probióticos são de ≥ 6 Log UFC.g ou mL⁻¹ de alimento (FAO/WHO, 2002) e, no presente estudo, observaram-se valores finais acima de 10 Log UFC.mL⁻¹. Além do mais, devido sua composição e pH próximo da neutralidade, o sorvete, quando comparado aos leites e bebidas fermentadas, proporciona uma viabilidade expressivamente maior de microrganismos probióticos durante sua fabricação e armazenamento (HOMAYOUNI et al., 2012).

Diversos autores relatam que devem ser utilizadas concentrações elevadas de inóculo, tendo em vista que uma redução inicial das contagens celulares pode ocorrer devido ao estresse mecânico durante a incorporação de ar do produto e ainda, pelo seu congelamento prolongado, fatores que desencadeariam a injúria celular (HOMAYOUNI et al., 2012; VALÉRIO et al. 2014; TRIPATHI & GIRI, 2014).

CRUXEN et al. (2017), em sorvete de butiá suplementado com *Bifidobacterium lactis*, não observaram alterações significativas na viabilidade da bactéria após 90 dias de armazenamento a -18 °C e VALÉRIO et al. (2014) em sorvete suplementado com *Lactobacillus acidophilus* La-5 com e sem inulina, não verificaram diferenças significativas durante 28 dias de armazenamento a -18 °C, dados que diferem do encontrado no presente estudo.

Entretanto, LAMOUNIER et al. (2012), em sorvete enriquecido com fibra de linhaça e suplementado com *Lactobacillus acidophilus*, após 28 dias de armazenamento a -18 °C, observaram reduções nas contagens celulares nos primeiros dias de armazenamento, corroborando com o observado no presente estudo.

Logo, mesmo após 180 dias de armazenamento, e com reduções significativas na contagem de células viáveis em comparação à concentração inicial, ambas as bactérias avaliadas apresentaram elevada taxa de sobrevivência no sorvete, evidenciando seu potencial como matriz alimentar para adição de probióticos.

4. CONCLUSÕES

Os isolados *Lactobacillus casei* CSL3 e *Pediococcus pentosaceus* P97, demonstraram-se promissores como probióticos para adição na matriz alimentar escolhida, sorvete, uma vez que mantiveram satisfatórias concentrações de células viáveis, sob as condições de armazenamento, apresentando-se superior ao preconizado pela legislação mundial. Destaca-se ainda, que *P. pentosaceus* P97, obteve melhor desempenho quando em comparação ao *L. casei* CSL3.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIS. Associação Brasileira de Indústrias de Sorvetes. **Sorvete**. 2019. Acessado em 14 set 2020. Disponível em: [http:// www.abis.com.br/estat.asp](http://www.abis.com.br/estat.asp)
- ASIOLI, D.; ASCHEMANN-WITZEL, J.; CAPUTO, V.; VECCHIO, R.; ANNUNZIATA, A.; NÆS, T.; VARELA, P. Making sense of the “clean label” trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. **Food Research International**, v. 99, p. 58–71. 2017.
- COSTA, E. S.; VARAVALLA, M. A. Probióticos e prebióticos: relações com a imunidade e promoção da saúde. **Revista Científica do ITPAC**, v. 4, n. 2. 2011.
- 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**, Acessado em 14 set 2020. Disponível em: [10.1016/j.lwt.2016.09.011](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.09.011) 2017.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization FAO/WHO. 2001. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba. Acessado em 10 set 2020. 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. 2020.
- 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, n. 1, p. 1-10. 2012.
- LAMOUNIER, M. L.; ARAÚJO, R. A. B. M.; LAMOUNIER, M. L.; MORZELLE, M. C. Desenvolvimento de sorvete enriquecido com fibras de linhaça e lactobacilos vivos e sua viabilidade. **Revista Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v. 67, n. 387, p. 57-63, 2012.
- MARQUES, J. L. **Atividade probiótica de *Pediococcus pentosaceus* P47 e P97: caracterização *in vitro*, aplicação em sistema alimentar e modulação da resposta imune *in vivo***. 2018. 107f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Curso de Pós Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 1–7. 2010.
- TERPOU, A.; PAPADAKI, A.; LAPPA, I. K.; KACHRIMANIDOU, V.; BOSNEA, L. A.; KOPSAHELIS, N. Probiotics in food systems: Significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. **Nutrients**, v. 11, n. 7, p. 1–32. 2019.
- 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, G. D. **Desenvolvimento de sorvete funcional: avaliação de suas características físicoquímicas, microbiológicas e sensoriais**. 2014. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite). Curso de Pós-graduação Stricto Sensu em Ciência e Tecnologia do Leite. Universidade Norte do Paraná, Londrina.
- 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. 2018.