

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de  
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

## VIABILIDADE DE *Lactobacillus casei* CSL3 EM SORVETE SOB CONDIÇÕES DO TRÂNSITO GASTROINTESTINAL SIMULADO E DE ARMAZENAMENTO

K.B. Massaut<sup>1</sup>, M.F.F. Siqueira<sup>2</sup>, H.R.S. Vitola<sup>3</sup>, A.L. Oliveira<sup>4</sup>, W. P. Silva<sup>5</sup>, A.M. Fiorentini<sup>6</sup>

1- Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – CEP: 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil, Telefone: (53) 3275-7378 – Fax: (53) 3275-9031 – e-mail: ([khadijamassaut@gmail.com](mailto:khadijamassaut@gmail.com))

2- Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – CEP: 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil, Telefone: (53) 3275-7378 – Fax: (53) 3275-9031 – e-mail: ([maria.fernanda.fs97@gmail.com](mailto:maria.fernanda.fs97@gmail.com))

3 - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – CEP: 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil, Telefone: (53) 3275-7378 – Fax: (53) 3275-9031 – e-mail: ([helena\\_rsv@hotmail.com](mailto:helena_rsv@hotmail.com))

4 - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – CEP: 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil, Telefone: (53) 3275-7378 – Fax: (53) 3275-9031 – e-mail: ([alaneh09@gmail.com](mailto:alaneh09@gmail.com))

5 - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – CEP: 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil, Telefone: (53) 3275-7378 – Fax: (53) 3275-9031 – e-mail: ([wladimir.padilha2011@gmail.com](mailto:wladimir.padilha2011@gmail.com))

6 - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – CEP: 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil, Telefone: (53) 3275-7378 – Fax: (53) 3275-9031 – e-mail: ([angefiore@gmail.com](mailto:angefiore@gmail.com))

**RESUMO** – A bactéria ácido-láctica *Lactobacillus casei* CSL3 foi suplementada em sorvete com objetivo de avaliar sua viabilidade sob condições simuladas do trânsito gastrointestinal e armazenamento do produto. Em todas as fases do trânsito gastrointestinal avaliadas, foram observadas contagens > 6 log UFC.g<sup>-1</sup>, e ao final de 180 dias de armazenamento sob -18 °C, foram observadas contagens > 10 log UFC.g<sup>-1</sup>. Conclui-se que o sorvete é uma matriz alimentar eficaz para assegurar a sobrevivência de *L. casei* CSL3, pois protegeu das condições do trânsito gastrointestinal e de armazenamento do produto.

**ABSTRACT** – The lactic acid bacteria *Lactobacillus casei* CSL3 was supplemented in ice cream in order to assess its viability under storage and simulated gastrointestinal transit conditions. In all phases of gastrointestinal transit evaluated, counts > 6 log UFC.g<sup>-1</sup> were observed, and at the end of 180 days of storage under -18 °C, counts > 10 log UFC.g<sup>-1</sup> were observed. It is concluded that ice cream is an effective food matrix

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



[www.officeeventos.com.br](http://www.officeeventos.com.br)



to ensure the survival of *L. casei* CSL3, as it protected from the conditions of gastrointestinal transit and product storage.

**PALAVRAS-CHAVE:** probiótico, matriz alimentar, bactéria ácido-láctica

**KEYWORDS:** probiotic, food matrix, lactic acid bacteria

## 1. INTRODUÇÃO

Microrganismos probióticos, além de conferirem benefícios ao hospedeiro, devem ser capazes não só de sobreviver ao processamento industrial, mas também de manter sua viabilidade e funcionalidade ao final das etapas de produção, distribuição e ingestão do alimento (FAO/WHO 2001; Ranadheera et al. 2010). Logo, inúmeros testes devem ser realizados no intuito de garantir a segurança e os benefícios atribuídos ao seu consumo, sua capacidade de resistir às barreiras impostas pelo trato gastrointestinal, mantendo-se viável e também, de resistir ao estresse sob o processamento e armazenamento em diferentes matrizes alimentares em concentração recomendada de 6-7 log UFC. g<sup>-1</sup> (FAO/WHO 2002; Morelli, 2007; Ranadheera et al. 2010).

Alimentos lácteos fermentados são os veículos mais utilizados, atualmente, para a comercialização de alimentos probióticos, uma vez que são armazenados em cadeia do frio e possuem período de validade reduzido (Antunes et al., 2004). Além disso, seu processo de fabricação proporciona uma melhor adaptação dos microrganismos às diferentes concentrações de pH em que são expostos durante o processo digestivo, ponto decisivo para assegurar sua viabilidade e potencial probiótico ao colonizar o intestino, proporcionando benefícios à saúde do hospedeiro (Chen et al. 2012; Rodrigues et al. 2019).

Inúmeros estudos sugerem que o sorvete seja um alimento adequado para a suplementação com probióticos, devido ao processamento e armazenamento sob baixas temperaturas, em virtude de possuir essencialmente proteínas e gorduras em sua composição e, principalmente, por favorecer a sobrevivência dos microrganismos durante o processo de armazenamento/comercialização (Homayouni et al., 2012; Ranadheera et al. 2012). Ademais, seu sabor adocicado e textura macia, o tornam um alimento aceito por todas as faixas etárias, aumentando assim o interesse do setor industrial em investir na comercialização de produtos com apelo de saudabilidade, como os probióticos (Cruz et al., 2009; ABIS, 2019).

*Lactobacillus casei* CSL3, foi isolado de silagem de colostro bovino por Vitola et al. (2018) e apresentou segurança e potencial probiótico *in vitro*. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a viabilidade de *L. casei* CSL3 suplementado em sorvete, durante a simulação ao trânsito gastrointestinal simulado e o armazenamento de congelamento prolongado.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Primeiramente, realizou-se o cultivo de *L. casei* CSL3, em caldo De Man Rogosa & Sharpe (MRS) por 18 horas a 37 °C, sob agitação constante a 130 oscilações/minuto. Em seguida, o caldo foi centrifugado a 4.165 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), congelado e depois liofilizado. A contagem de células viáveis liofilizadas,



foi realizada em placas contendo ágar MRS, incubadas à 37 °C, por 48 horas, sob anaerobiose. E a bactéria liofilizada foi armazenada a -70 °C, até sua utilização.

Para realização da análise de viabilidade, o sorvete foi obtido no comércio local da cidade de Pelotas/RS e mantido sob refrigeração até a realização do estudo. 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. Na sequência, 0,1% da cultura probiótica (14 log UFC.g<sup>-1</sup>) foi adicionada ao sorvete, sendo misturada com uma espátula por 30 segundos para homogeneização adequada. As amostras foram distribuídas em recipientes plásticos de 100 mL e armazenadas a -18 °C, até o momento da análise.

Para a simulação *in vitro* do trânsito gastrointestinal (TGI) foi utilizada a metodologia descrita por Madureira et al. (2010), com modificações de Vitola et al. (2020). O teste foi realizado sob 60 dias de armazenamento onde, 10 g de sorvete foram adicionadas a 90 mL de solução salina acidificada em pH 2,5 e em seguida, levados ao equipamento *Stomacher* por 30 segundos, para a simulação da mastigação. Logo após, segregou-se a amostra em frasco esterilizado, adicionando-se a enzima pepsina. Foi realizada a primeira contagem em placas (Antes do gástrico – AG) com ágar MRS sendo as mesmas incubadas à 37 °C, por 48 h, em anaerobiose. O conjunto permaneceu em equipamento *Shaker* por 90 minutos, a 130 rpm e 37 °C. Na sequência foi realizada a segunda contagem em placas (Pós gástrico – PG) e incubação nas mesmas condições citadas anteriormente. O pH foi alterado com solução de bicarbonato de sódio 1M até o pH 5. Posteriormente, adicionou-se pancreatina e bile, sendo levado novamente para o *Shaker*, por 20 minutos, a 45 rpm e 37 °C. Realizou-se a terceira contagem em placas (Duodeno – D). Após, foi adicionado novamente solução de bicarbonato de sódio 1M para se obter o pH 6,5, o frasco foi para o *Shaker* por mais 90 minutos, 45 rpm e 37 °C. Realizou-se a última contagem em placas (Íleo – I).

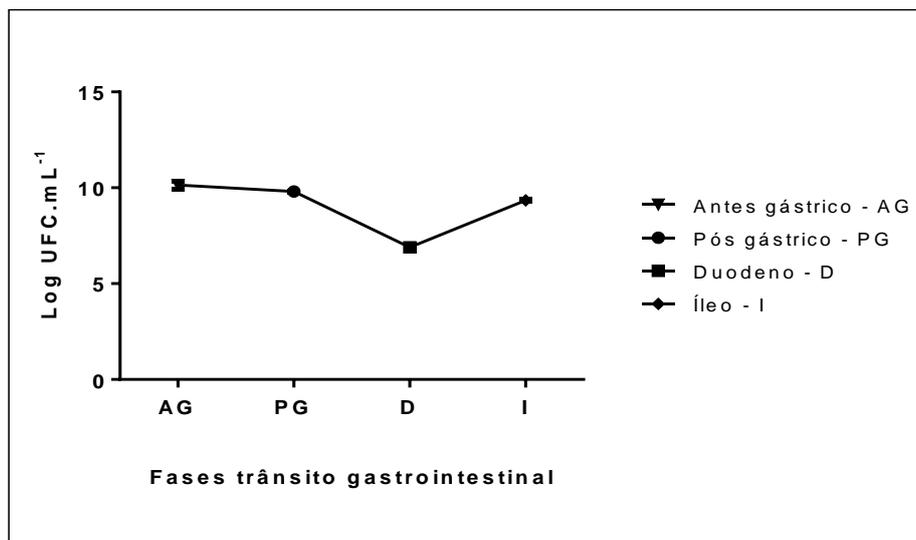
As análises microbiológicas para o monitoramento da viabilidade da bactéria foram realizadas em triplicata: após a preparação do sorvete (tempo 0) e em 30, 90 e 180 dias de armazenamento congelado, conforme descrito por Cruxen et al. (2017). Para determinação da contagem de células viáveis, 10 g de amostra foram homogeneizados em 90 mL de água peptona a 0,1% (Oxoid®). Após, foram realizadas diluições decimais em série (até 10<sup>-10</sup>) e inoculados 0,1 mL da suspensão em placas de Petri contendo ágar MRS. As placas foram colocadas 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: *One-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

Segundo demonstrado na Figura 1, houve diferença significativa entre todas as fases de simulação do TGI (p<0,0001). No teste de *Tukey*, observou-se que ocorreram reduções significativas entre as fases AG vs D, AG vs I e PG vs D (p<0,0001, p=0,0078 e p<0,0001 respectivamente) e aumento significativo entre as fases D vs I (p=0,0001) indicando que embora tenha ocorrido uma redução na fase do Duodeno, a bactéria foi capaz de se multiplicar na fase de Íleo, onde o pH estava próximo da neutralidade. Observou-se ainda, que durante todas as fases simuladas, *L. casei* CSL3 manteve-se viável e ao final apresentou contagens superiores ao preconizado pela FAO/WHO (2002) podendo-se afirmar, que possui potencial probiótico quando suplementada em sorvete, podendo colonizar o intestino.

Figura 1: Viabilidade de *L. casei* CSL3 suplementado em sorvete sob as condições do trânsito gastrointestinal simulado *in vitro*.

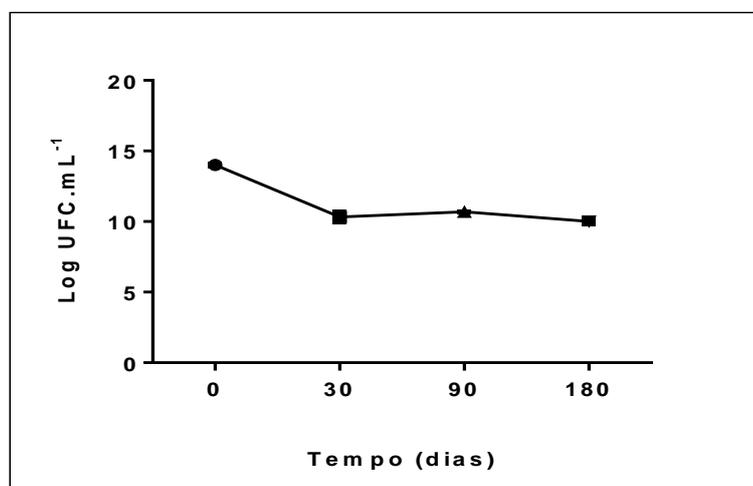


Fonte: Autores

No estudo de Vitola et al. (2020), ao avaliar as condições de simulação do TGI do queijo *petit-suisse*, verificaram que a viabilidade da bactéria *L. casei* CSL3, não foi afetada, apresentando contagens finais  $> 7 \log \text{UFC.g}^{-1}$  em ambas formulações (livre e imobilizada em abacaxi), Ames (2019) também observou contagens finais satisfatórias  $> 7 \log \text{UFC.g}^{-1}$  no iogurte com a bactéria imobilizada e, no presente estudo, as contagens finais de *L. casei* CSL3 foram  $> 9 \log \text{UFC.g}^{-1}$ , evidenciando que a utilização do sorvete como matriz alimentar foi capaz de influenciar positivamente na sobrevivência da bactéria durante o processo digestivo.

Conforme pode ser observado na Figura 2, na análise de variância, houve diferença significativa ao longo do período de armazenamento ( $p < 0,0001$ ). E no pós teste de Tukey, entre os períodos, observou-se reduções significativas no tempo 0 vs 30, 0 vs 90 e 0 vs 180 com valor de  $p < 0,0001$  e, entre os dias 90 vs 180 com valor de  $p = 0,0230$ , indicando que o sorvete, embora seja uma matriz alimentar com concentrações significativas de ar incorporado, foi capaz de proteger a bactéria do estresse oxidativo causado pela presença de oxigênio, mantendo uma contagem de  $10 \log \text{UFC.g}^{-1}$ , acima do estabelecido pela legislação para alimentos suplementados com probiótico que é de  $6-7 \log \text{UFC.g}^{-1}$  (FAO/WHO, 2002).

Figura 2: Viabilidade de *L. casei* CSL3 suplementado em sorvete sob 180 dias de armazenamento ( $-18^\circ\text{C}$ ).





Fonte: Autores

Estes resultados demonstram que mesmo após 180 dias de armazenamento, e com reduções significativas na contagem de células viáveis em comparação à concentração inicial, a bactéria apresentou altas taxas de sobrevivência na matriz utilizada, corroborando com os estudos de Ames (2019), onde verificou-se que em iogurte com *L. casei* CSL3 imobilizado em aveia, armazenado por 25 dias a 4 °C, houveram concentrações satisfatórias da bactéria (8,78 log UFC.g<sup>-1</sup>), Belinazo et al. (2019), que também verificaram em manteiga suplementada com *L. casei* CSL3, sob 60 dias de armazenamento refrigerado (4 °C) concentrações > 6 log UFC.g<sup>-1</sup> de células viáveis e Vitola et al. (2020), onde foi adicionado ao queijo *petit-suisse* *L. casei* CSL3 livre e imobilizado em abacaxi, observando-se que em ambas formulações as contagens do microrganismo foram satisfatórias (8,99 log UFC.g<sup>-1</sup> e 8,78 log UFC.g<sup>-1</sup>, respectivamente) ao longo de 8 semanas de armazenamento.

Em relação ao sorvete, alguns autores referem que o congelamento prolongado, bem como o estresse mecânico e a incorporação de ar durante o processo de fabricação do produto, podem ocasionar a injúria da célula, gerando redução nas contagens de células viáveis, motivo pelo qual, recomenda-se a utilização de concentrações elevadas de inóculo no início do processo (Homayouni et al., 2012; Valério et al. 2014; Tripathi & Giri, 2014). Em sorvete de butiá suplementado com *Bifidobacterium lactis*, Cruxen et al. (2017), não observaram alterações significativas na viabilidade da bactéria após 90 dias de armazenamento a -18 °C, diferentemente do verificado no presente estudo, onde houve uma redução de 4 log UFC.g<sup>-1</sup> após 180 dias de armazenamento.

## 4. CONCLUSÕES

*Lactobacillus casei* CSL3, isolado de silagem de colostro bovino, apresentou-se como uma bactéria probiótica promissora para adição em matrizes alimentares de origem láctea, como o sorvete, tendo em vista que tolerou as condições do trânsito gastrointestinal simulado e manteve as concentrações de células viáveis satisfatoriamente, sob as condições de armazenamento, com valores acima do preconizado pela legislação mundial.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Associação Brasileira de Indústrias de Sorvetes. **Sorvete**. 2019. Disponível em: <http://www.abis.com.br/estat.asp>
- Ames, C.W. (2019). *Lactobacillus casei* CSL3: imobilização celular em aveia e aplicação como cultura probiótica na produção de iogurte. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- Antunes, A. E. C., Antunes, A. J., Cardello, H. M. A. B. (2004). Chemical, physical, microstructural and sensory properties of set fat-free yogurts stabilized with whey protein concentrate. *Milchwissenschaft*, 59(3–4), 161–165.
- 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. (2019). Probiotic butter: Viability of *Lactobacillus casei* strains and bixin antioxidant effect (*Bixa orellana* L.). *Journal of Food Processing and Preservation*, e(14088). Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfpp.14088>
- Chen, S., Cao, Y., Ferguson, L. R., Shu, Q., & Garg, S. (2012). Flow cytometric assessment of the protectants for enhanced in vitro survival of probiotic lactic acid bacteria through simulated human gastro-intestinal stresses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95, 345–356.



- Cruxen, C.E.S., Hoffmann, J.F., Zandoná, G.P., Fiorentini, A.M., Rombaldi, C.V., Chaves, F.C. (2017). Probiotic butiá (*Butia odorata*) ice cream: Development, characterization, stability of bioactive compounds, and viability of *Bifidobacterium lactis* during storage. *LWT - Food Science and Technology*. Disponível em: 10.1016/j.lwt.2016.09.011.
- Cruz, A. G., Antunes, A. E. C., Sousa, A. L. P., Faria, J. A. F., & Saad, S. M. I. (2009). Icecream as a probiotic food carrier. *Food Research International*, 42, 1233–1239.
- Homayouni, A., Azizi, A., Javadi, M., Mahdipour, S., Ejtahed, H. (2012). Factors influencing probiotic survival in ice cream: a review. *International Journal of Dairy Science*. 7 (1), 1-10.
- Madureira, A. R., Amorim, M., Gomes, A. M., Pintado, M. E., Malcata, F. X. (2011). Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*. 44, 465–470.
- Morelli, L. (2007). In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. *International Dairy Journal*, 17, 1278–1283. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.01.015>.
- 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. Disponível em: [ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport\\_en.pdf](ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf)
- Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization. FAO/WHO. (2002). *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. London, Ontario, Canada.
- Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S. K., & Adams, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43(1), 1–7.
- Ranadheera, R. D. C. S., Evans, C. A., Adams, M. C., & Baines, S. K. (2012). In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. *Food Research International*, 49, 619–625.
- Rodrigues, V. C. C., Silva, L. G. S., Simabuco, F. M., Venema, K., Antunes, A. E. C. (2019). Survival, metabolic status and cellular morphology of probiotics in dairy products and dietary supplement after simulated digestion. *Journal of Functional Foods*. 55, 126–134.
- Tripathi, M.K., & GIRI, S.K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*. 9, 225–241.
- Valério, Geisa Demele. (2014). Desenvolvimento de sorvete funcional: avaliação de suas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. (Dissertação de mestrado). Universidade Norte do Paraná, Londrina.
- Vitola, H.R.S., Dannenberg, G.S., Marques, J.L., Lopes, G.V.; Silva, W.P., Fiorentini, A.M. (2018). Probiotic potential of *Lactobacillus casei* CSL3 isolated from bovine colostrum silage and its viability capacity immobilized in soybean. *Process Biochemistry*, 73, 1-7.
- Vitola, H.R.S., Cruxen, C. E. S., Silva, F. T., Thiel, P. R., Marques, J.L., Silva, W.P.; Fiorentini, A.M. (2020). *Lactobacillus casei* CSL3: Evaluation of supports for cell immobilization, viability during storage in Petit Suisse cheese and passage through gastrointestinal transit in vitro. *LWT - Food Science and Technology* 127, 109381.