

## AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE ALIMENTOS PROBIÓTICOS DE ORIGEM NÃO LÁCTEA COM CÉLULAS DE *LACTOBACILLUS*

MELISSA PLÁCIDO<sup>1</sup>  
UBIRAJARA COUTINHO FILHO<sup>2</sup>  
KAMILA GUEDES SIQUEIRA<sup>3</sup>

### RESUMO

A alimentação adequada possibilita garantir uma melhor qualidade de vida, com diminuição dos riscos de desenvolvimento de doenças e toxi-infecções, além de manter as funções vitais, com a garantia do pleno crescimento, desenvolvimento e manutenção do organismo. Assim o acesso a informação proporcionado pela educação e meios de comunicação faz com que cada vez mais seja expressiva o número de pessoas que buscam novos alimentos que sejam saudáveis. Neste contexto se encaixa o presente trabalho que objetivou gerar novos tipos de alimentos probióticos associados a combinação de chocolate e frutas. Foram testadas a adição de coco, uva e banana ao chocolate, bem como a adição das bactérias *Lactobacillus acidophilus La5* e *Lactobacillus paracasei Shirota* aos alimentos citados, e feita a comparação da sobrevivência destas nestes alimentos. Como resultados foi constatado que: a) a adição das frutas ao chocolate aumenta a atividade de água dos alimentos; b) preparações de chocolate puro convencional apresentam maior estabilidade que os adicionados de frutas; c) há diferença na estabilidade entre os dois *Lactobacillus* usados.

**Palavras-chave:** probióticos, chocolate, frutas e *Lactobacillus*.

---

1 Graduada em Engenharia Química pela UFU-MG

2 Doutor em Genética e Bioquímica pela UFU-MG e Professor da Faculdade de Engenharia Química da UFU

3 Graduada em Engenharia Química pela UFU-MG

## ABSTRACT

The proper nutrition allows a better quality of life, reducing risks of disease development, and it also keeps vital functions, with the assurance of full growth, development and maintenance of organism. So the access to information provided by education and media makes increasingly be significant the number of people who it looks for new foods that are healthy. In this context, the present work fits that the purpose is generate a new sort of probiotic foods associated with a combination of chocolate and fruits. It was tested chocolate with coco, grape and banana, as well as the bacterias *Lactobacillus acidophilus La5* e *Lactobacillus casei Shirota*, and it was compared the survival in these foods. It was found: a) the addition of fruit to chocolate increases food water activity; b) pure chocolate preparations have greater stability than the chocolate with fruits; c) it has difference in stability between the *Lactobacillus* that was used.

**Key words:** probiotics, chocolate, fruits and *Lactobacillus*.

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de novos alimentos é uma prática capaz de melhorar a qualidade de vida humana, ampliar o mercado das indústrias de alimentos e favorecer a participação do Brasil no mercado de alimentos (HOBBS et al 2002; TRIENEKENS, ZUURBIER, 2008; PERI, 2006). Esta discussão é válida para a busca de novos alimentos com particular destaque para os probióticos que hoje representam cerca de 65% do mercado de alimentos funcionais (VINDEROLA, 2008; RANADHEERA ET AL 2010; BURGAIN et al 2011).

Os probióticos são alimentos e produtos constituídos por microrganismos vivos que uma vez introduzidos no organismo, por exemplo na forma de alimentação ou via oral, influenciam beneficemente a saúde por mecanismos ainda não totalmente compreendidos que envolvem a formação de uma microbiota capaz de evitar infecções, estimular a digestão e estimular o sistema imune. Assim probióticos podem ser utilizados na

manutenção e reestabelecimento da saúde de humanos e animais, em processos de biorremediação de ambientes contaminados e na busca, para animais, do ganho de peso, melhora na resistência a doenças, auxílio na recuperação de infecções e decréscimo no consumo de antimicrobianos (GONG et al, 2002; SAMANYA, YAMAUCHI, 2002; SANTOS et al 2007; FULLER 1989).

Na formulação de probióticos são utilizados diversos microrganismos entre os quais se destacam bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidum*, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* e os fungos do gênero *Saccharomyces* e *Aspergillus* (SIMPSON et al, 2004; STROMPFOVÁ et al 2004). Entre estes microrganismos há um especial interesse no uso dos *Lactobacillus*, *Bifidum* e *Saccharomyces* pelo fato desses microrganismos serem de uso considerado seguro (GRAS –microorganism generally recognized as safety) em alimentos (BALCÁZAR et. al., 2006; SAARELA et. al., 2000). Entre as cepas de interesse para alimentação humana tem-se especial destaque para os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, com destaque para os *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* em diversas variedades como *Lactobacillus acidophilus LA5*, *Lactobacillus casei Shirota (LcS)* que são amplamente usados em produtos comerciais como bebidas láteas, iogurtes e na forma encapsulada (RANADHEERA ET AL 2010; BURGAIN et al 2011).

Pelas dimensões do mercado e efeitos benéficos amplamente já divulgados tem-se que a presente linha de pesquisa se destaca como pesquisa de interesse prático. Este interesse vale tanto pelo uso do probióticos quanto pelo alimento escolhido, pois o chocolate e doces são apreciados há séculos. Para o chocolate em particular tem-se que há um efeito positivo em muitos dos problemas de saúde humana (LIPPI, 2009) e para frutas tem-se que entre as propostas de melhora da qualidade da alimentação está a troca de doces por frutas (JAIME et. al. 2008). As principais associações do consumo de chocolate ao efeito benéfico para saúde estão associadas a presença antioxidantes flavonoides do cacau que atuam positivamente na redução do colesterol LDL, redução da oxidação do colesterol HDL, redução da agregação plaquetária e ação anti-inflamatória (SHIINA et al 2009). Já o hábito de ingestão frutas favorece a saúde pelas fibras, vitaminas e pelo fato da maior a troca de alimentos gordurosos e salgados por frutas ser capaz de reduzir os problemas associados à obesidade (WHO, 2002; JAIME et. al. 2008).

Além da importância associada a saúde pelo chocolate e frutas o trabalho também é importante pelo fato que estes produtos escolhidos representam alimentos apreciados por uma ampla faixa da população que engloba tanto crianças como os adultos. O consumo de frutas no Brasil nos últimos anos vem aumentando nos últimos anos. Referente ao chocolate, no ano de 2007 o consumo de chocolate já ultrapassava 6,5 milhões de toneladas, sendo que a produção no Estado da Bahia é uma das maiores áreas produtora do mundo (BEGUN et al 2007; QUEIROZ et al 2003). Para que esta possibilidade seja convertida em novos probióticos de chocolate, é importante que ensaios de estabilidade e estudos específicos com as cepas de interesse sejam realizados de forma que se prove a estabilidade do produto e resistência do mesmo ao processo digestivo. (WOHLGEMUTH, BLAUT 2010).

Assim há grande interesse no registro de estudos que descrevam diferentes testes para alimentos que contenham probióticos com cepas variadas, pois falhas geradas pelo processo de purificação e pelas condições adversas do processamento do alimento podem ser reduzidas pela redução da atividade de água e pela imobilização das células. As perdas de viabilidade celular ocorrida no processamento dos probióticos/ simbióticos pode ser reduzida pela melhora da resistência das células pela ação de osmólitos que estabilizam a estrutura de proteínas e membranas das células frente a inativação osmótica, desidratação e ação de moléculas capazes de alterar a estrutura da proteína ou membrana. Entre os osmólitos mais utilizados encontram-se carboidratos; polióis; aminoácidos e derivados; metilaminas (GIULIO et al 2005; PRASAD et al 2003; BASKAKOV, BOLEN, 1998; YANCEY, 2001).

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Alimentos**

Os alimentos utilizados no experimento foram: chocolate ao leite, coco ralado, uva e banana passas.

### **2.2 Micro-organismos**

A cepa de *Lactobacillus acidophilus* La5 obtida de Chistian Hansen (São Paulo, Brasil) e *Lactobacillus casei* Shirota isolado da bebida láctea Yakult foram utilizadas como microorganismos nos ensaios. Estas cepas foram armazenadas a 4°C e repicadas após 7 dias e 14 dias em meio MRS após serem fermentadas – como na Figura 2 –, também neste meio: conduzidas em erlenmeyers de 250 mL em incubador rotativo (30°C, 150 rpm, 48h). As células geradas foram separadas do meio por ultracentrifusão a 15000g, para serem colocadas no chocolate. Foram feitos ensaios preliminares de fermentação para escolha do tempo de fermentação que apresentasse melhor resultado, 24h ou 48h.



Figura 1 - Meio MRS líquido adicionados de microrganismos

A composição do meio de cultura MRS líquido é: Glicose (20 g/L), peptona de caseína (10 g/L), extrato de carne (10 g/L), extrato de levedura (5 g/L), tween 80 (1 g/L), fosfato de dipotássico (2 g/L), acetato de sódio (5 g/L), citrato de amônio (2 g/L), sulfato de manganês (0,05 g/L), sulfato de magnésio (0,2 g/L). Para o plaqueamento meio é Agar MRS: utiliza-se a mesma composição acima, porém adiciona-se ainda ágar (12 g/L).

### 2.3 Contagem celular

As amostras de chocolate foram preparadas em metodologia específica para produtos de chocolate e cacau que consiste em dissolver o material em leite em pó desnatado reconstituído (10% p/v) na temperatura de 45°C seguido do uso da mistura

leite chocolate no plaqueamento. Para cada amostra de chocolate (3g diluída em 10 mL de leite) foram feitas dissoluções sucessivas adequadas e a concentração de células foi obtida por contagem em triplicata das unidades formadoras obtidas após 48h do plaqueamento em superfície (Figura 1) em meio Agar MRS mantido a 25°C.



Figura 2 - Representação ilustrativa do plaqueamento na quantificação de células obtida em um dos ensaios com *Lactobacillus casei* Shirota

#### 2.4 Atividade de água

As formulações foram avaliadas pela atividade de água inicial determinada instrumentalmente utilizando o equipamento Novasina Thermoconstanter (modelo RS 232/RTD 200) que avalia a atividade de água ( $A_w$ ) pela umidade de equilíbrio (UR%) como mostra a Equação 1.

$$A_w = (UR) / 100 \quad (1)$$

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

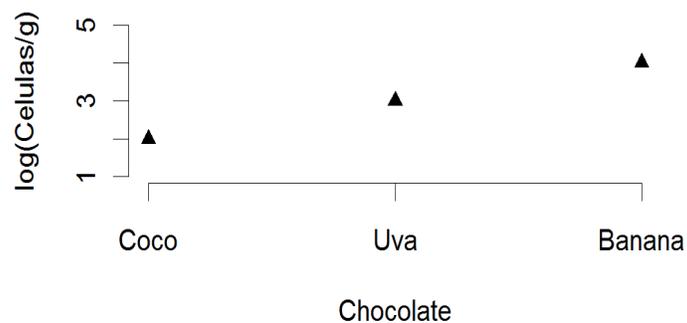
A Figura 4 apresenta as concentrações de células para formulações com *Lactobacillus acidophilus* La5 e *Lactobacillus casei* Shirota obtidas nas preparações de fruta e chocolate obtidas para 7 dias de armazenamento a 25°C feitas com o uso de coco,

uva e banana na proporção de 67% em massa de chocolate e 33% de doce de fruta. Pode-se observar que as formulações com *Lactobacillus acidophilus* La5 foram mais estáveis que as formulações com *Lactobacillus casei* Shirota, pois para os resultados com maior viabilidade observados em formulações com *Lactobacillus casei* Shirota apresentam a mesma concentração celular observada nas formulações com menor viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La5, sendo que o melhor resultado das formulação mais estável (coco com *Lactobacillus acidophilus* La5) apresenta concentração celular 1000 vezes maior que a observada nas melhores condições com *L. paracasei* Shirota.



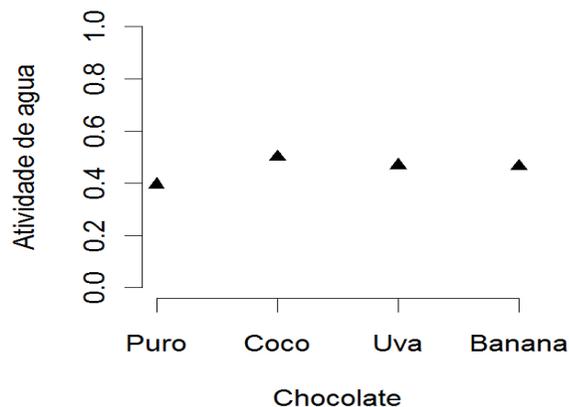
**Figura 3 - Efeito da variedade probiótica no chocolate com frutas na viabilidade das células para sete dias de armazenamento do produto probiótico**

A Figura 5 mostra as viabilidades das células probióticas nas formulações mais estáveis (formulações contendo *Lactobacillus acidophilus* La5) para 14 dias de armazenamento do produto. Pode-se observar que para este período os melhores resultados foram obtidos para formulações com banana ( $10^4$  células/g). Para 14 dias de armazenamento nas condições ambientes nenhuma das preparações apresentou concentração celular mínima de  $10^6$  células/g, que representa o valor recomendado para consumo humano. A comparação deste valor com chocolate ao leite puro mostra que adição de preparações de fruta nesta proporção reduz a viabilidade das células pois conforme mostra Teixeira e colaboradores (2012) chocolate ao leite preparado nas mesmas condições deste ensaio apresenta uma concentração de células superior a  $10^6$  células/g para 15 dias de preparo.



**Figura 4 - Viabilidade das células de *Lactobacillus acidophilus* La5 para 14 dias de armazenamento**

A Figura 6 apresenta o resultado da avaliação da atividade de água dos diferentes chocolates. Pode-se observar que a adição de preparações de frutas aumenta a atividade de água das preparações probióticas, mas estas ainda apresentam valor que favorece a conservação.



**Figura 5 - Resultado da avaliação da atividade de água dos diferentes chocolates**

#### 4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados é possível inferir que as preparações com *Lactobacillus casei* Shirota em chocolate com frutas são menos estáveis que as mesmas preparações *Lactobacillus acidophilus* La5 e estas são menos estáveis que as preparações com chocolate puro.

O uso de diferentes preparações de frutas (coco, uva e banana) mostra que a fruta escolhida influi na estabilidade e esta influência varia segundo a espécie de microrganismo probiótico escolhido.

A adição de frutas ao chocolate aumenta a atividade de água, mas este aumento não pode ser considerado a razão de ter a menor estabilidade, pelo fato de a atividade final do chocolate com frutas ainda ser baixa ( $A_w < 0,6$ ).

Para o *Lactobacillus casei* Shirota o melhor resultado foi encontrado para uva passas. E para o *Lactobacillus acidophilus* La5 o melhor resultado foi encontrado para o coco para armazenamento de 7 dias e banana de 14 dias.

## 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Faculdade de Engenharia Química – UFU, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), CNPq e Pró-reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Uberlândia (Propp-UFU) pelos recursos concedidos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALCÁZAR, J.L; BLAS, I; RUIZ-ZARZUELA, I ;CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MÚZQUIZ, L The role of probiotics in aquaculture Veterinary Microbiology - v. 114, N. 3-4, p. 173-186, 2006.

BURGAIN,J; GAIANI,C. ;LINDER, M; SCHER, J Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications Journal of Food Engineering, n. 104, p. 467–483, 2011.

FULLER, R. Probiotics in man and animals: a review. Journal of Applied Bacteriology, v.66, n.3, p.365-78, 1989.

GONG ,J.; FORSTER, R. J.; YU, H.; CHAMBERS; J. R. ; WHEATCROFT, R.; SABOUR, P. M.; CHEN, S. Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum, FEMS Microbiology Ecology, v. 41, p. 171-179, 2002.

HOBBS, J.E, FEARNE, A.; jamSPRIGGS, J. Incentive structures for food safety and quality assurance: an international comparison Food Control, v. 13, p. 77–81, 2002.

LIPPI, 2009.

PERI, C. The universe of food quality *Food Quality and Preference* 17, P. 3–8, 2006.

RANADHEERA, R.D.C.S.; BAINES, S.K.; ADAMS, M.C Importance of food in probiotic efficacy *Food Research International*, v. 43, p. 1–7, 2010.

SANTOS, A.B; CARDOSO, V.L.; COUTINHO FILHO, U; Estudo da desativação térmica de simbiótico de uso veterinário XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos P.1-5, 2007.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; MATTO, G; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties, *Journal of Biotechnology*, v.84, p.197–215, 2000.

SAMANYA, M. ; YAMAUCHI, K. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. natto *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, v.133 , p.95–104, 2002.

SHIINA, Y.; FUNABASHI, N.; LEE, K.; FURAYAMA, T.; NAKAMURA, K.; WAKATSUKI, Y.; DAIMON, M.; KOMURO, I. Acute effect of oral flavonoid-rich dark chocolate intake on coronary circulation, as compared with non-flavonoid white chocolate, by transthoracic Doppler echocardiography in healthy adults *International Journal of Cardiology*, v.131, N. 3, p.424-429, 2009.

SIMPSON, P.J. ; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C.; ROSS R.P The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal feed *Journal of Microbiological Methods*, v.57 , p9 – 16, 2004.

STROMPFOVÁ, V.; LAUKOVÁ, A., OUWEHAND, A.C Selection of enterococci for potential canine probiotic additives, *Veterinary Microbiology*, v.100, p.107–114, 2004. TEIXEIRA, 2012.

TRIENEKENS, J.; ZUURBIER, P. Quality and safety standards in the food industry, developments and challenges *Int. J. Production Economics*, v. 113, p. 107–122 , 2008.

VINDEROLA, G. Dried cell-free fraction of fermented milks: new functional additives for the food industry *Trends in Food Science & Technology*, v.19, p.40-46, 2008.

World Health Organization. Diet, nutrition and prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation. Geneva; 2002 (WHO Technical Report Series, 916). [Citado 2012 abril 17]. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_916.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_916.pdf).